

**GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MESANE KANSERLİ HASTALARDA**  
**KROMOZOM 4q22-35 BÖLGESİNDEKİ**  
**HETEROZİGOTLUK KAYIPLARININ**  
**ARAŞTIRILMASI**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ÇİĞDEM TAŞ**  
**EYLÜL 2011**

**Mesane Kanserli Hastalarda Kromozom 4q22-35  
Bölgesindeki Heterozigotluk Kayıplarının Araştırılması**

**Gaziantep Üniversitesi**

**Biyoloji Bölümü**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman**

**Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Çiğdem TAŞ**

**Eylül 2011**

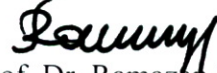
T.C.  
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Mesane Kanseri Hastalarda Kromozom 4q22-35 Bölgesindeki Heterozigotluk Kayıplarının Araştırılması

Öğrencinin Adı, Soyadı: Çiğdem TAŞ

Tez Savunma Tarihi: 29 Eylül 2011

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı




Prof. Dr. Ramazan KOÇ  
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylıyorum.




Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.



Yrd. Doç. Dr. Beyhan Cengiz  
Tez İkinci Danışmanı



Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN  
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

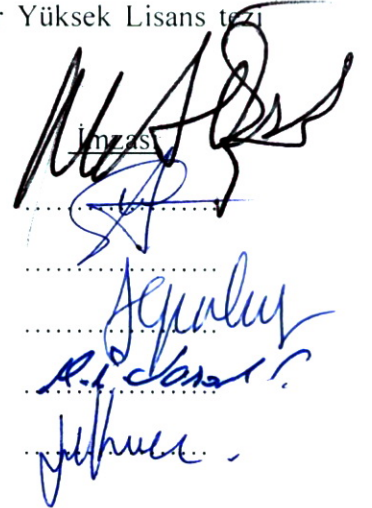
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK

Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER

Yrd. Doç. Dr. İsmail VAROL

Yrd. Doç. Dr. İ.Halil KILIÇ



İmzası  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

## ÖZET

### MESANE KANSERLİ HASTALARDA KROMOZOM 4q22-35 BÖLGESİNDEKİ HETEROZİGOTLUK KAYIPLARININ ARAŞTIRILMASI

TAŞ, Çiğdem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Eylül 2011, 68 sayfa

Kanser, hücre bölünmesini kontrol eden veya hızlandıran genlerin fonksiyon kaybı veya çok aktif oluşu ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Tümör baskılayıcı genlerin delesyonu veya ekspresyonlarının azalması kanserin genetik ve epigenetik nedenleri arasında gösterilebilir. Heterozigotluk kaybı (LOH) analizi kanser türüne özgü aday tümör baskılayıcı gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan etkili bir metottür. Mesane kanseri ülkemizde ve dünyada birçok insanı etkileyen ve her yıl binlerce insanın ölümüne neden olan bir hastalıktır. Mesane kanserlerinde daha önceden yapılan genom tarama çalışmalarında dördüncü kromozomun uzun kolunda telomere yakın bölgeler üzerinde mikro kayıpların fazlalığı dikkat çekmiştir. Ancak, bu bölgelerin ayrıntılı bir kayıp haritası çıkarılmamıştır. Bu çalışmada kromozom 4q22-35 bölgesi 25 mesane kanserli hastada 13 mikrosatellit markır kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan analizlerde üç kayıp bölgesi dikkat çekmektedir. Birinci bölge D4S1564 markır ve çevresi, ikinci bölge D4S1644 markırının bulunduğu bölge ve üçüncü bölge ise D4S2979 markır ve çevresi olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak mesane kanserlerinde kromozom 4q22-35 bölgesi için CASP6, DDK2, SAP30, CASP3, SMARCA5 ve ING2 genleri aday tümör baskılayıcı gen olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Mesane kanseri, kromozomal kayıplar, kromozom 4q

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF LOSS OF HETEROZYGOSITY ON CHROMOSOME 4q22-35 REGION IN PATIENTS WITH BLADDER CANCER**

TAŞ, Çiğdem

M.Sc. in Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

September 2011, 68 pages

Cancer is a disease that occurs by losses of function of the genes controlling or accelerating the cell division or by their being highly active. Deletion of tumor suppressor genes or decreasing their expressions can be shown among the genetic or epigenetic reasons of cancer. Loss of heterozygosity (LOH) analysis is an effective method used in determining the candidate tumor suppressor gene areas peculiar to the cancer type. Urinary bladder cancer is a disease affecting lots of people in our country and all over the world and causes to death of thousands each year. It has drawn attention that in the genome screening studies of urinary bladder cancer cases done previously; there is a surplus of the micro losses on the areas close to telomere on the long chol of the fourth chromosome. However, a detailed loss mapping of these areas couldn't be done. In this study, chromosome 4q22-35 area was analysed by using 13 microsatellite markers in 25 patients with urinary bladder cancer. In the analyses three loss areas have attracted the attentions. It was identified that the first area is D4S1564 marker and its around, second area is D4S1644 marker and its around and the third one is D4S2979 marker and its around. As a result, in urinary bladder cancer cases for chromosome 4q22-35 area, CASP6, DDK2, SAP30, CASP3, SMARCA5 and ING2 genes are specified as candidate tumor suppressor genes.

**Key Words:** Urinary bladder cancer, chromosomal losses, chromosome 4q

## **TEŞEKKÜR**

Tez çalışmalarım sırasında benden her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, engin bilgileri ile bana yol gösteren sayın danışman hocam Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a;

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini benden esirgemeyen ikinci tez danışmanım sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Beyhan CENGİZ' e;

Çalışmalarım için bana laboratuvarlarının imkânlarını sunan Fizyoloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Cahit BAĞCI'ya ve Tıbbi Genetik ve Biyoloji anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Ahmet ASLAN'a;

Çalışmalarım sırasında bana yardımcı ve manevi destek olan Fizyoloji anabilim dalından Yrd. Doç. Dr. Şeniz DEMİRYÜREK, Duygu DÜŞMEZ ve Davut KAPLAN' a, Tıbbi genetik ve biyoloji çalışanları Mehri İĞCI ve Zeynep EŞLİK'e;

Tez yazımım sırasında bana yardımcı olan mesai arkadaşım Ar. Gör. Fatih YAYLA'ya;

Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında spesifik aletlerin temininde yardımını esirgemeyen Aydemir KALEBEK'e

Hayattaki en büyük şansım olan annem, babam ve birtanem EŞİME;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.....	3
LİTERATÜR TARAMASI.....	3
BÖLÜM 3.....	8
GENEL BİLGİLER.....	8
3.1. Kanser.....	8
3.1.1 Dünya’da ve Türkiye’de Kanser.....	8
3.1.2 Kanser Türleri:.....	9
3.1.3 Kansere Neden Olan Genler.....	10
3.1.3.1 Proto-onkogenler.....	10
3.1.3.2 Tümör Baskılayıcı Genler.....	11
3.2. Heterozigotluk Kaybı (Loss of Heterozigosity, LOH).....	11
3.2.1. LOH Mekanizması.....	12
3.2.2. Heterozigotluk Kaybının Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar.....	13
3.2.2.1 Mikrosatellit Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, Polimeraze Chain Reaction (PCR)).....	13
3.2.2.2 Karyotip analizi:.....	13
3.2.2.3 Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) :.....	14
3.2.2.4.Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) analizi:.....	14
3.2.2.5.Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) :.....	14
3.3. Mesane Kanseri.....	14
3.3.1. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi.....	15

3.3.2. Mesane Kanserinin Histopatolojik Tipleri.....	16
3.3.3. Mesane Kanserinin Derecelendirilmesi ve Evrelendirilmesi.....	16
3.3.3.1. Derecelendirilmesi: .....	16
3.3.3.2. Evrelendirme: .....	17
3.3.4. Mesane Kanserinin Nedenleri.....	19
3.3.4.1. Çevresel Etmenler .....	19
3.3.4.2. Genetik Faktörler.....	21
<b>BÖLÜM 4.....</b>	<b>27</b>
<b>MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>27</b>
4.1. Materyal.....	27
4.1.1. Cihazlar ve kimyasallar .....	27
4.2. Yöntem .....	28
4.2.1. DNA İzolasyonu: .....	28
4.2.2. DNA'ların Hazırlanması:.....	28
4.2.3. Primerlerin Hazırlanması:.....	30
4.2.4. PCR:.....	30
4.2.4.1. PCR'da kullanılan primerler .....	30
4.2.5. %2'lik Agaroz Jel Elektroforezi .....	34
4.2.6. %7'lik Denatüre Poliakrilamid Jel.....	34
4.2.6.1. Gerekli çözeltiler .....	34
4.2.6.2. Jelin Hazırlanması .....	34
4.2.6.3. Camlar, Aralayıcılar ve Tarakların Temizlenmesi.....	35
4.2.6.4. Örneklerin Hazırlanması .....	35
4.2.6.5. Sistemin hazırlanması .....	35
4.2.7. Gümüş nitrat boyama.....	35
4.2.7.1. Gümüş nitrat boyamada kullanılan çözeltiler .....	35
4.2.7.2. Gümüş Nitrat boyamanın aşamaları.....	36
4.2.8. Sonuçların Değerlendirilmesi .....	36
<b>BÖLÜM 5.....</b>	<b>37</b>
<b>BULGULAR .....</b>	<b>37</b>



5.1. PCR Sonuçlarının Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi Sonucu Elde Edilen Bulgular.....	37
5.2. LOH Analizi .....	44
5.2.1. D4S2909 nolu Markır Bulguları .....	44
5.2.2. D4S1647 nolu Markır Bulguları .....	44
5.2.3. D4S1564 nolu Markır Bulguları .....	45
5.2.4. D4S2623 nolu Markır Bulguları .....	45
5.2.5. D4S406 nolu Markır Bulguları .....	46
5.2.6. D4S407 nolu Markır Bulguları .....	46
5.2.7. D4S402 nolu Markır Bulguları .....	47
5.2.8. D4S2394 nolu Markır Bulguları .....	47
5.2.9. D4S1644 nolu Markır Bulguları: .....	48
5.2.10. D4S1625 nolu Markır Bulguları .....	49
5.2.11. D4S2979 nolu Markır Bulguları .....	49
5.2.12. D4S408 nolu Markır Bulguları .....	50
5.2.13. D4S1652 nolu Markır Bulguları .....	50
<b>BÖLÜM 6</b> .....	54
<b>TARTIŞMA VE SONUÇ</b> .....	54
<b>KAYNAKLAR</b> .....	59

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 3.1.</b> Onkogenlerin Mutasyonu .....	11
<b>Şekil 3.2.</b> Knudson'un çift vuruş hipotezi .....	12
<b>Şekil 3.3.</b> Mesane kanserinin evreleri .....	18
<b>Şekil 5.1.</b> D4S2909 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü .....	37
<b>Şekil 5.2.</b> D4S1647 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	38
<b>Şekil 5.3.</b> D4S1564 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	38
<b>Şekil 5.4.</b> D4S2623 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	39
<b>Şekil 5.5.</b> D4S406 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	39
<b>Şekil 5.6.</b> D4S407 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	40
<b>Şekil 5.7.</b> D4S402 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	40
<b>Şekil 5.8.</b> D4S2394 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	41
<b>Şekil 5.9.</b> D4S1644 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	41
<b>Şekil 5.10.</b> D4S1625 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	42
<b>Şekil 5.11.</b> D4S2979 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	42
<b>Şekil 5.12.</b> D4S408 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	43
<b>Şekil 5.13.</b> D4S1652 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü.....	43
<b>Şekil 5.14.</b> D4S2909 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	44
<b>Şekil 5.15.</b> D4S1647 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	45
<b>Şekil 5.16.</b> D4S1564 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	45
<b>Şekil 5.17.</b> D4S2623 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	46

<b>Şekil 5.18.</b> D4S406 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	46
<b>Şekil 5.19.</b> D4S407 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	47
<b>Şekil 5.20.</b> D4S402 markırına ait homozigot, heterozigotluğun resmi .....	47
<b>Şekil 5.21.</b> D4S2394 markırına ait homozigot, heterozigotluğun resmi .....	48
<b>Şekil 5.22.</b> D4S1644 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	48
<b>Şekil 5.23.</b> D4S1625 markırına ait homozigot resmi .....	49
<b>Şekil 5.24.</b> D4S2979 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	49
<b>Şekil 5.25.</b> D4S408 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	50
<b>Şekil 5. 26.</b> D4S1652 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi .....	50
<b>Şekil 5.27.</b> Markırlara göre LOH dağılımının grafiksel gösterimi .....	52
<b>Şekil 5.28.</b> Kromozom 4q22-35 bölgesinde bulunan markırlar ve buldukları bölgelerde bulunan genlerin yerlerini gösteren kromozom haritası .....	53

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 3.1:</b> Türkiye’de erkek ve kadınlarda en sık rastlanan kanser türleri ve oranları.....	9
<b>Tablo 3.2:</b> Mesane kanserine neden olduğu tahmin edilen çevresel etmenler/koşullar ve maruz kalma şekilleri.....	20
<b>Tablo 3.3:</b> Transiyonel hücre karsinomunda bilinen genlerin genetik ve epigenetik değişiklikleri.....	22
<b>Tablo 3.4:</b> Transiyonel hücre karsinomunda LOH analizi ile belirlenen yaygın delesyon bölgeleri.....	23
<b>Tablo 3.5:</b> Transiyonel hücre karsinomunda yaygın bulunan kromozomal değişiklikler.....	23
<b>Tablo 4.1:</b> İzole edilen DNA’ların spektrofotometrik ölçümleri ve konsantrasyonlarının 50ng/μl ‘ye seyreltilmesi için gerekli DNA ve ddH <sub>2</sub> O miktarı.....	28
<b>Tablo 4.2:</b> PCR’da kullanılan primerler, dizilimleri ve PCR ürün büyüklükleri .....	30
<b>Tablo 4.3:</b> PCR protokolü.....	31
<b>Tablo 4.4:</b> Her primere özel PCR’da kullanılan sıcaklıklar .....	32
<b>Tablo 5.1:</b> Mesane kanserli hastaların her birinin kullanılan markırlarda tespit edilen LOH analizi sonucu.....	51

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%	: Yüzde
µl	: Mikrolitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APS	: Amonyum per sülfat
bp	: Baz çifti (base pair)
CASP3	: Kaspaz 3 (caspase 3)
CASP6	: Kaspaz 6 (caspase 6)
CCND1	: Siklin D1 (cyclin D1)
CDKN2	: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2)
CHG	:Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (Comparative Genomic Hybridization)
CIS	: Karsinoma <i>in situ</i> (Carsinoma <i>in situ</i> )
dATP	: Adenozin tri fosfat
DBC1	: Mesane kanserinde silinmiş 1(Deleted in Bladder Cancer 1)
DBCCR1	: Mesane kanserinde kromozom bölgesi 1'de silinmiş (Deleted in Bladder Cancer Chromosomal Region 1)
dCTP	: Sitozin tri fosfat
ddH <sub>2</sub> O	: Double distile su
dGTP	: Guanozin tri fosfat
dk	: Dakika
DKK2	: Dickkopf 2
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Nükleotit tri fosfat
DSÖ (WHO)	: Dünya sağlık örgütü (world health organization)
dTTP	: Timidin tri fosfat
DS	: DNA segment

E2F3	: E2F transkripsiyon faktörü 3 (E2F transcription factor 3)
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal Growth Factor)
EGFR	: EGF reseptörü (EGF receptor)
ELF2	: E74-benzeri faktör 2 (E-74 Like Factor 2)
ERBB2	: Eritroblastik lösemi viral onkogen homologu 2 (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2)
FGFR3	: Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 3 (Fibroblast growth factor receptor 3)
FHIT	: Kırılgan histidin üçlü geni (fragile histidine triad gene)
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
g	: Gram
HCC	: Hepatoselüler karsinom (hepatocellular carcinoma)
HNSCC	: Baş ve boyun squamöz hücreli karsinom (Head and neck squamous cell carcinoma)
HRAS	: Harvey sıçan sarkom viral onkogen homologu (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)
ING2	: Büyüme faktörü inhibitörü 2 (Inhibitor of growth factor 2)
KRAS	: Kristen sıçan sarkom viral onkogen homologu (Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog)
LEF1	: Lenfoid arttırıcı bağlayıcı faktör 1 (lymphoid enhancer binding factor 1)
LOH	: Heterozigotluk kaybı (Loss of Heterozygosity)
LRP1B	: Düşük ağırlıklı lipoprotein reseptörü ilişkili protein 1B (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1B)
MDM2	: Fare çift dakika 2 (the murine double minute 2)
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
MS	: Mikrosatellit
MYC	: Miyelositomatozis viral onkogen homologu (myelocytomatosis viral oncogene homolog)
Na <sub>2</sub> EDTA	: Sodyum iki EDTA
ng	: Nanogram

NRAS	: Nöroblastoma RAS (Neuroblastoma RAS)
°C	: Santigrat derece
PAH	: Fenilalanin hidroksilaz
PAPSS1	: 3'-fosfoadenozin 5'-fosfosülfat sentaz 1(3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1)
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)
PDHA2	: Pirüvat dehidrojenaz alfa 2 (pyruvate dehydrogenase alpha 2)
PITX2	: Homeodomain 2 benzeri çift (paired-like homedomain 2)
PPA2	: Pirofosfotaz (inorganik) 2 (pyrophosphatase (inorganic)2)
PTCH	: Yamalı (patched)
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog (phosphatase and tensin homolog)
RAB33B	: Ras ilişkili protein (ras related protein)
RASSF1A	: Ras ilişkili domain aile üye 1A (ras association domain family member 1A)
RB	: Retinoblastoma
RE	: Restriksiyon endonükleaz enzimleri
RFLP	: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizm analizi (Restriction fragment length polymorphism)
RRH	: Retinal pigment epiteli-elde edilen rodopsin homologu (retinal pigment epithelium-derived rhodopsin homolog)
SAP30	: Sin3A-ilişkili protein (sin3A-associated protein)
SMARCA5	: SWI/SNF ilgili, matris ilişkili, aktin bağımlı kromatin regülatörü alt aile a, üye 5 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin subfamily a, member 5)
SSCP	: Tek iplikcikli uygunluk polimorfizmi (single-strand conformation polymorphism)
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TCC	: Transiyonel hücre karsinomu (transitional cell carcinoma)
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetrametilendiamin
TNM	: Tümör-Lenf nodu-Metastaz
TP53	: Tümör protein p53 (tumor protein p 53)
TSC1	: Tüberküloz skleroz 1 (tuberous sclerosis1)

TSG (TBG) : Tümör baskılayıcı gen (tumor supressor gene)  
UV : Ultra-viyole (Mor tesi)  
VCP : Valosin içeren protein (valosin containing protein)  
VEGFC : Vasküler endotelyal büyüme faktörü C (vascular endothelial growth factor C)



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Kanser günümüzde en büyük sağlık sorunlarından biridir ve dünya üzerinde birçok kanser türü vardır. Bunlardan biri de mesane kanseridir. Mesane kanseri erkeklerde dördüncü kadınlarda ise sekizinci sırada en sık rastlanan kanser türüdür. Mesane kanseri genellikle orta yaş ve üzeri bireylerde daha sık görülür. Mesane kanserine tanı konulduğunda bulguların yaklaşık %85'inin mesanede lokalize olduğu, %15'inin bölgesel lenf düğümlerine veya uzak bölgelere metastaz yapmış olduğu görülmektedir [1].

Mesane kanserine neden olan birçok etmen vardır. Bunları çevresel etmenler ve kalıtsal etmenler olarak gruplandırmak mümkündür [2]. Çevresel etmenler içerisinde ilk sıraları sigara kullanımı ve/veya aromatik amin maruziyeti alırken genetik etmenlerin ilk sıralarını ise onkogenlerin ekspresyonlarının artması ve/veya tümör baskılayıcı genlerin kaybolması veya ekspresyonlarının azalması almaktadır [3].

Kanser hücrenin temel düzenleyici mekanizmalarındaki kusurlardan kaynaklandığı için, özellikle moleküler ve hücresel düzeyde değerlendirilmesi gereken bir hastalıktır. Moleküler biyologlar ile hücre biyologları bu yüzden kanseri anlayabilmek için yıllarca uğraş vermişler, daha da önemlisi, kanser araştırmaları sayesinde aynı zamanda hücrelerin normal davranışlarını düzenleyen mekanizmaları aydınlatmışlardır. Hücrede; sinyal iletimi, hücre döngüsünün ve programlı hücre ölümünün düzenlenmesi gibi işlemlerde anahtar görev üstlenen proteinlerin birçoğu, ilk kez, hücrenin kontrolsüz çoğalmasına yol açan anormal aktiviteleri nedeniyle tanımlanabilmiştir. Kanser araştırmaları bu yönüyle hücrelerin çalışmasını düzenleyen mekanizmaların anlaşılmasına önemli ölçüde katkıda bulunmuş, bu mekanizmalar da kanseri anlamamıza yardımcı olmuştur [4].

Neoplastik tümörlerde yaygın gözlenen genetik değişikliklerden biri heterozigotluk kaybıdır (LOH). Spesifik genomik bölgelerde LOH aday tümör baskılayıcı gen

bölgelerinin tanımlanmasında kullanılır [5]. Mesane kanseri üzerine yapılan heterozigotluk kaybı çalışmalarında kromozom 3, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17 ve 21'de değişen oranlarda kayıp bölgeleri tespit edilmiştir [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Fakat en yüksek oranlarda kayıp kromozom 9, 11 ve 17'de görülmektedir [8, 9, 11, 12]

Mesane kanseri ile ilgili olarak yapılan genom tarama çalışmalarında kromozom 4q'da yüksek oranda kayıp olduğu dikkat çekmektedir. Bununla birlikte kromozom 4q ile ilgili yapılan kanser çalışmalarında farklı kanser tiplerinde farklı oranlarda LOH tespit edilmiştir. Örneğin; hepatoselüler kanser, baş boyun kanseri, göğüs kanseri, malinant mezotelyum, küçük hücreli akciğer kanseri, oral kanser vb. [13, 14, 15, 16, 17]. Bu bölgede değişik kanser tiplerinde gösterilen LOH bu bölge içerisinde bir veya daha fazla aday tümör baskılayıcı gen olma ihtimalini ortaya koynuştur. Fakat mesane kanserinde bu bölge ile ilgili ayrıntılı bir çalışma yapılmamıştır. Biz bu noktadan hareketle mesane kanserinde kromozom 4q22-35 bölgesindeki heterozigotluk kayıplarını belirlemeyi dolayısıyla aday tümör baskılayıcı genleri tespit etmeyi amaçladık.

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR TARAMASI

Mesane kanseri ile ilgili olarak yapılan birçok LOH çalışmasında özellikle kromozom 9, 11, 17 başta olmak üzere birçok kromozom (2, 4, 8, 9, 11, 13, 14, 17, 18) üzerindeki kayıpların bu kanserin ortaya çıkması ile ilişkisi olabileceği belirtilmiştir.

4. kromozomdaki kayıplarla farklı kanser türlerinin arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalarda 4. kromozom üzerindeki kayıpların mesane kanserinde de etkili olduğuna atıfta bulunulmuştur [13, 14, 15, 16].

Tsai vd. (1990) 25 mesane kanserli hasta üzerinde yaptıkları çalışmada kromozom 6'nın p kolunda %31, kromozom 9'un q kolunda % 67, kromozom 11'in p kolunda %39, kromozom 14'ün q kolunda %19 ve kromozom 17'nin p kolunda %63 oranında delesyon bulduklarını bildirmişlerdir [18].

Miyao vd. (1993) yaptıkları bir çalışmada kromozom 9 üzerinde birden fazla kayıp bölgesi olduğunu ve bu aday tümör baskılayıcı genlerin muhtemelen 9p12 ile 9q34.1 bölgesi arasında lokalize olduğunu bildirmişlerdir [19].

Ruppert vd. (1993) yaptıkları çalışmada 9p21 bölgesi ile telomer bölgesi arasında kayıp bölgesi tespit ettiklerini bildirmişler ve burada mesane kanseri ile ilgili iki tane tümör baskılayıcı gen bölgesi olduğunu öne sürmüşlerdir [20].

Cairns vd. (1993) çalışmalarında kromozom 9 üzerinde silinmiş bölgedeki hedef genin 9q22 ile 9p12-13 arasına yerleştiğini öne sürmüşlerdir [21].

Knowles vd. (1994) çalışmalarında kromozom 9'un p kolunda %51, q kolunda ise %57, kromozom 11'in p kolunda %32, kromozom 17'nin p kolunda %32 oranında allelik kayıp olduğunu ve kromozom 4'ün p kolunda ilk defa LOH (%22) gösterdiklerini bildirmişlerdir [22].

Polascik vd. (1995) çalışmalarında 282 mesane kanserli taze doku ve 34 markır ile kromozom 4'ün hem q hem de p kolunun üzerinde kromozomal kayıp araştırması yapmışlar ve bu bölgelerde önemli kayıp alanlara rastladıklarını bildirmişlerdir. Onbeş markır ile kromozom 4'ün p kolu, ondokuz markır ile de q kolundaki kayıp bölgelerini araştırmışlar ve p kolunda D4S1608 ve D4S404 mikrosatellit markırları arasında %29 oranında kayıp gösteren 3-cM'lik küçük bir bölge; q kolunda D4S426 ve D4S408 markırları arasında %24 oranında kayıp gösteren 14-cM'lik büyük bir bölge belirlediklerini bildirmişlerir. Bu iki bölgedeki kayıplarla bu lezyonun ileri derece ve evrede olmasının ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir [23].

Chang vd. (1995) mesane kanserli 285 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada kromozom 14'ün p kolundaki kaybı %25,3 olarak bulduklarını bildirmişler ve invazif tümörlerde kromozom 14q12 ve 14q32.1-32.2'de iki potansiyel tümör baskılayıcı gen bölgesi öne sürmüşlerdir [24].

Rosin vd. (1995) karsinoma *in situ* (CIS)'lü 31 hastanın 13 farklı kromozom bölgesinde 29 mikrosatellit markır ile yaptıkları LOH analizi sonucunda kromozom 9p'de %61, 9q'da %61, 8p'de %65, 17p'de %60, 13q'da %56, 11p'de %54 ve 4q'da %52 oarında LOH bulduklarını bildirmişlerdir [25].

Simon vd. (1998) mesane kanserli 46 doku üzerinde yaptıkları çalışmada pT1'de kromozom 9'un q kolunda %64, p kolunda %57, kromozom 11'in p kolunda %57, q kolunda %50 oranında, kromozom 4q'da ise %26,5 oranında kayba rastladıklarını bildirmişlerdir [10].

Piao vd. (1998) çalışmalarında hepatoselüler karsinomlu 41 hastada 4q üzerindeki kayıpları araştırmışlar ve bir veya daha fazla bölgede %82,9 oranında allelik dengesizlik saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu noktadan hareketle kromozomun 4q'nun bu kanser türünün agresif ilerlemesinde önemli bir rol oynayabileceğini ve bu bölge üzerinde bu kanser türünde etkili olan bir çok aday tümör baskılayıcı gen bulunabileceğini öne sürmüşlerdir [13].

Nishiyama vd. (1999) çalışmalarında 9q32-33 bölgesinde mesane kanseri için bir aday tümör baskılayıcı gen bölgesi olabileceğini öne sürmüşlerdir [11]. Bu bölgede bir tümör baskılayıcı gen olduğunu Habuchi vd. (1997) de yapmış olduğu çalışmada

belirtmiştir [26]. Habuchi vd. (1998) daha sonra yaptıkları çalışmada bu bölgede metilasyonla *DBCCR1* geninin susturulduğunu ve bu genin aday tümör baskılayıcı gen olabileceğini öne sürmüşlerdir [27].

Shaw vd. (1999) çalışmalarında şistomiasisli mesane kanserli 70 hastada yaptıkları çalışmada, kromozom 9'un p kolunda *CDKN2* gen bölgesinde %65, kromozom 17'nin p kolunda %58, kromozom 3'ün p kolunda %40, kromozom 9'un q kolunda %39, kromozom 8'in p kolunda %37 oranında kromozomal kayıp bulmuşlardır. 9p geni, muhtemelen *CDKN2*, Şistomiaz ilişkili mesane tümörlerinin çoğunluğunun gelişimine katkıda bulunabildiği ama 9q genlerin çok daha az önemli bir rol oynadığını düşündürdüğü sonucuna varmışlardır. Yine bu çalışma da bu kromozomlara ek olarak 4p, 4q, 11p, 11q, 13q, 14q ve 18q'da LOH tespit ettiklerini ve LOH oranını D4S408 nolu markırın bulunduğu 4q32-q33 bölgesinde %22, D4S1535 nolu markırın bulunduğu 4q33 bölgesinde %37 olarak bulduklarını bildirmişlerdir [28].

Hornigold vd. (1999) çalışmalarında 9q34 bölgesindeki *TSC1* geninin mesane kanseri için aday bir tümör baskılayıcı gen olabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir [29].

Shivapurkar vd. (1999) çalışmalarında 44 göğüs kanserli hastadan alınan DNA'ları 19 polimorfik mikrosatellit markır kullanılarak araştırmışlar ve 4 bölgede yüksek oranda kayıp bulduklarını bildirmişlerdir. Bu bölgeler ve kayıp oranları; 4q33-34 %76, 4q25-26 %63, 4p15.1-15.3 %57, 4p16.3 %50'dir. Bu çalışmanın sonucunda kromozom 4'ün her iki kolunda göğüs kanserinde etkili aday tümör baskılayıcı genler olabileceğini öne sürmüşlerdir [15].

Shivapurkar vd. (1999) malignant mezotelyom ve küçük hücreli akciğer kanseriyle ilgili olarak yaptıkları çalışmada 20 malignant mezotelyumlu, 21 küçük hücreli akciğer kanserli ve 20 küçük hücreli olmayan akciğer kanserli hastadan alınan DNA örneklerini 16 polimorfik markır kullanarak 4. kromozom üzerindeki kayıp bölgelerini araştırmış ve 4q33-34 bölgesinde %80, 4q25-26 bölgesinde %60 ve 4p15.1-15.3 %50'den fazla kayıp bulduklarını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda bu bölgelerde malignant mezotelyom ve küçük hücreli akciğer kanseri ile ilgili 3 aday tümör baskılayıcı genin varolabileceğini öne sürmüşlerdir [16].

Wada vd. (2000) çalışmalarında 13q11-12.1'de %21, *RB* geninin bulunduğu 13q14.3'te %32 oranında kromozomal kayıp bulduklarını ve *RB* genindeki allelik kayıpların tümörün düşük evre ve dereceleriyle ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir [7].

Langbein vd. (2002) *LRP1B* gen bölgesindeki değişiklikler ile yüksek dereceli ürotelyal kanser arasındaki ilişkiyi araştıran çalışmalarında kromozom 2q'da derece1, 2 ve 3'te sırasıyla %17, 518 ve %63 oranında LOH olduğunu ve *LRP1B* geninin ürotelyal kanserler için aday tümör baskılayıcı gen olabileceğini ileri sürmüşlerdir [6].

Tzai vd. (2003) ürotelyal karsinomanın allelotipik profillendirilmesi üzerine yaptıkları çalışmada kromozom 9'un p kolunda % 54.9, q kolunda %49.3, kromozom 13'ün q kolunda %40.8, kromozom 14'ün q kolunda %40.8, kromozom 17'nin p kolunda %39.4 oranında kayıp bulduklarını ve yine aynı çalışmada mesane kanserli hastalarda kromozom 4q'da %21,1 oranında LOH olduğunu bildirmişlerdir. 4q'daki kayıpların kas invazyonu arasında pozitif ilişki olduğunu ve kromozom 4q'nun diğer yüksek LOH oranına sahip bölgelerle birlikte mesane kanserinin ilerlemesinde rol alan aday tümör baskılayıcı gen bölgesi olabileceğini ileri sürmüşlerdir [9].

Hoque vd. (2003) Mesane kanserinin genetik karakterizasyonu konulu çalışmalarında kromozom 9'un q kolunda %76.67, p kolunda %70, kromozom 8'in p kolunda %50, q kolunda %43.33, kromozom 20'nin q kolunda %43 oranında kromozomal kayıp bulduklarını bildirmişlerdir [30].

Hurst vd. (2004) mesane kanseri üzerine yaptıkları çalışmalarında kromozom 4q'da %83 kısmi kayıp ve kromozom 4q'dan başka 18q'da %65, 8p'de %65, 2q'da %61, 6q'da %61, 3p'de %56, 13q'da %56, 4p, 6p, 10p ve 10q'da %52 ve 5p'de %43 oranında kayıp bildirmişler [8].

Çetin vd. (2008) çalışmalarında 4q22-35 bölgesinde 4q22, 4q25, 4q31 ve 4q34-35 olmak üzere 4 önemli delesyon bölgesi belirlediklerini bildirmişlerdir [14].

Chan vd. (2009) mesane kanseri üzerine yaptıkları karşılaştırmalı genomik hibridizasyon çalışmasında kromozom 4q'da %66,67 oranında allelik dengesizlik bulduklarını bildirmişlerdir [31].

## BÖLÜM 3

### GENEL BİLGİLER

#### 3.1. Kanser

Kanser hücresel düzeyde bir genetik düzensizlik olarak ele alınır [32]. Hücresel düzeyde kanserin gelişimi, mutasyonları içeren çok aşamalı bir süreç sonucunda çoğalma, sağ kalım, invazyon ve metastaz yetenekleri giderek artan hücrelerin seçilmesi şeklinde ortaya çıkar. Çok hücreli organizmalarda her hücrenin çoğalması, farklılaşması ve sağ kalımı organizmanın genel gereksinimleri doğrultusunda düzenlenir. Kanseri hücrelerinde bu olayları düzenleyen mekanizma ortadan kalkar. Hücreler kontrolsüz şekilde bölünerek çoğalmaya başlar ve sonunda tümör vücudun diğer bölgelerine yayılarak normal doku ve organların işlevlerini etkiler [4].

Kanserin ortaya çıkmasında birçok etken rol oynamaktadır. Bunlar genetik veya çevresel etkenler olabilir. Birçok tümör baskılayıcı genin yeri heterozigotluk kaybı (LOH) analizi ile saptanmıştır [8].

Kanser, birdenbire değil, zaman içinde birçok genetik değişimin bir araya gelmesi ile ortaya çıkar. Kanserin çok aşamalı bir olay olduğunu gösteren özelliklerden biri, birçok kanser türünün geç yaşlarda ortaya çıkmasıdır [4]. Örneğin, mesane kanseri 50-70 yaş arasında daha sık görülür [2]. Kanseri görülme sıklığının yaş ile bu kadar dramatik biçimde artması, birçok kanser türünün yıllar boyunca biriken çok sayıda anomalinin sonucu olarak geliştiğini düşündürür [4, 33].

##### 3.1.1. Dünya’da ve Türkiye’de Kanseri

Dünya sağlık örgütü raporuna (2008) göre küresel kanser yükü geçen otuz yıl zarfında iki kat daha fazla artmıştır. 2008 yılında 12 milyon yeni kanser vakasının teşhis edildiği, kanserden kaynaklanan 7 milyon ölümün gerçekleştiği, 2030 yılına



gelindiğinde ise 27 milyon yeni kanser vakası ve 17 milyon kanser kaynaklı ölüm beklendiğini bildirilmiştir [34].

Avrupa'daki ölümlerin %20'sinin nedeni kanserdir ve kanser kardiyovasküler hastalıklardan sonra en önemli ölüm nedenidir [34].

Dünya kanser raporu (2008)'na göre Türkiye kanser ile mücadelede gelişmekte olan ülkeler için örnek gösterilmiştir. Türkiye'de erkeklerde ve kadınlarda en sık rastlanan kanser türleri ve oranları Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1:** Türkiye'de erkek ve kadınlarda en sık rastlanan kanser türleri ve oranları [34]

<b>Cinsiyet</b>	<b>Kanser türü</b>	<b>Tüm kanserler içinde rastlanma oranı (%)</b>
Erkek	Nefes borusu, Bronş, Akciğer	33
	Mide	9
	Mesane	9
	Kalınbağırsak ve Rektum	8
	Prostat	6
Kadın	Meme	24
	Kalın bağırsak	9
	Mide	7
	Yumurtalık	6
	Nefes borusu, Bronş, Akciğer	6
	Lösemi	5
	Serviks	5

### **3.1.2. Kanser Türleri:**

Kanser vücutta yer alan herhangi bir hücrenin anormal çoğalması sonucu ortaya çıkabildiğinden; gerek davranış, gerekse tedaviye cevap yönünden önemli ölçüde değişiklik gösteren yüzden fazla değişik kanser türü mevcuttur. Kanser patolojisinde en önemli konu selim ve malin tümörleri birbirinden ayırabilmektir. Selim tümörler çevredeki dokuya ya da vücudun uzak bölgelerine yayılmadan oluştukları yerde kalırlar. Buna karşılık malin tümörler hem çevredeki normal dokuya hem de kan ya

da lenfatik sistem aracılığıyla vücudun diğer bölgelerine yayılırlar. Kanseri tehlikeli yapan bunların yayılma ve metastaz yapma özelliğidir [4].

Gerek malin gerekse selim tümörler türedikleri hücreye göre sınıflandırılırlar. Kanselerin çoğu üç ana grupta toplanabilir: karsinomlar, sarkomlar ve lösemi veya lenfomalar. İnsan kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturan karsinomlar epitelyum hücrelerinden kaynaklanan tümörlerdir. İnsanda az görülen sarkomlar kas, kemik, kıkırdak ve fibröz doku gibi bağ dokusundan gelişen solid tümörlerdir. İnsan tümörlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar ise sırasıyla kan ya da immün sistem hücrelerinden gelişir [4].

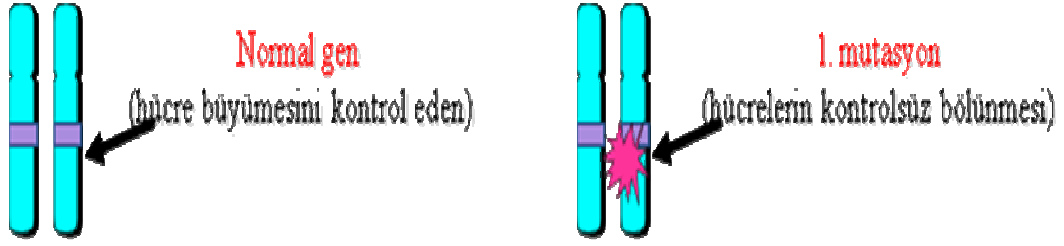
### **3.1.3. Kansere Neden Olan Genler**

Kanserle ilişkisi olan genler genel olarak iki grupta toplanır. Bunlar proto-onkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdir [35].

#### **3.1.3.1. Proto-onkogenler**

Proto-onkogenler, çoğunlukla normal hücre büyümesiyle ilgili metabolik yolun düzenleyici-sinyal moleküllerinin ve apoptotik metabolik yol proteinlerinin genleridir. Proto-onkogen, normal protein ürününün işlevi hücre çoğalmasını sağlamak olan ancak hücrel transformasyonu indüklemeye kapasitesine ve potansiyeline de sahip olan genlerdir [35]. Onkogenler proto-onkogenlerin varyasyonlarıdır ve proliferasyon ve hücre sinyalinin aktivasyonunda normal hücrelerde önemli roller oynarlar. Bu genler örneğin gen amplifikasyonu, aşırı ekspresyon, nokta mutasyon, insersiyonel mutasyon veya translokasyon özgü anormalliklerle aktif hale gelirler [36].

Onkogenler dominant etkilidir. İster anne ister baba kökenli proto-onkogen allellerden birinin mutasyonu, hücre döngüsünün sürekliliğini sağlayan bir aktif sinyal molekülü ya da antiapoptotik bir molekül olarak işlev kazanması için yeterlidir [35].



Şekil 3.1. Onkogenlerin Mutasyonu [5]

### 3.1.3.2. Tümör Baskılayıcı Genler

Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı insan kanserlerinin başlama ve/veya ilerlemesinde önemlidir [5]. Tümör baskılayıcı genleri etkileyen kodlayıcı bölgedeki yanlış anlamlı mutasyonlar, proteinin büyüklüğünü ve aktivitesini değiştiren çeşitli eksilme, artma ya da çerçeve kaydırıcı mutasyonlar proteinin aktivitesini azaltır ya da tamamen ortadan kaldırır [35]. Tümör baskılayıcı genler kanser hücrelerinde genellikle aktif değildirler [36].

### 3.2. Heterozigotluk Kaybı (Loss of Heterozygosity, LOH)

İnsan ve diğer 2n kromozomlu eşeyli üreyen canlılarda biri anneden diğeri babadan olmak üzere her kromozomdan bir çift bulunur. Bu kromozomlar üzerindeki düzenli tekrar bölgeleri homozigot veya heterozigot durumda bulunurlar [37]. LOH vücut hücrelerinde heterozigot bir lokusta bir allelin kaybolması olarak tanımlanır [36].

Çoğu insan kanseri genomik kararsızlık, çoklu genetik değişikliklerin toplanması ve genom boyunca allelik dengesizlik ile karakterize edilir. Genetik materyal kaybı solid tümörlerde en sık gözlenen genetik değişimdir ve bunun en yaygın mekanizması tümör baskılayıcı gen inaktivasyonudur. LOH allelik dengesizliğin en yaygın formudur ve LOH'un keşfi tümör baskılayıcı genlerin bulunduğu genomik bölgelerin belirlenmesinde ve farklı tümör tiplerini, patolojik evresi ve ilerlemeyi belirlemede kullanılmaktadır [30].

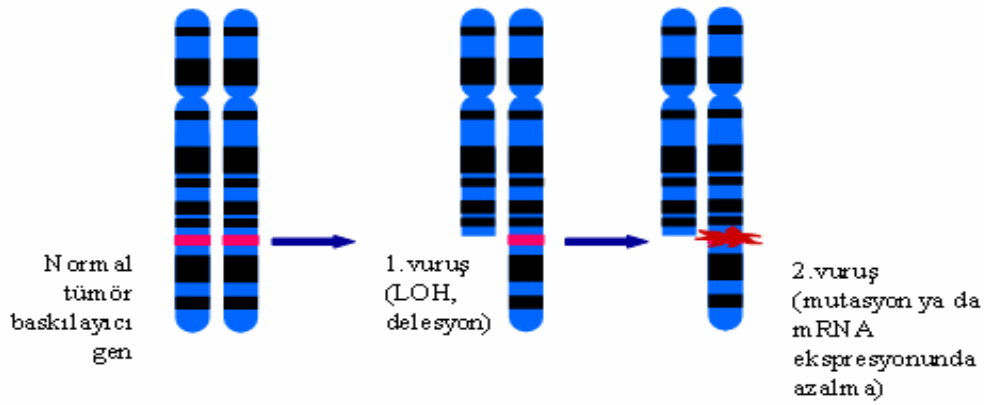
İnsan genomu mikrosatellit (MS) denilen 100.000'den fazla nükleotit tekrar bölgeleri içerir. Bunlar birbiri ardına sıralanan DNA tekrar sekanslarıdır ve insan genomunda çok sık ve yüksek polimorfik genetik elementleri ifade ederler. Bu DS markırları PCR amplifikasyonları ile gen haritalama, bağlantı analizlerinde ve LOH analizleri için kullanılır [38].

Alfred Knudson, Retinoblastoma üzerine yaptığı mutasyon ve kanser adlı çalışmasında ilk defa tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını kaybetmesine neden olan iki olaydan bahsetmektedir. Bu olaylar Knudson'un ikili vuruş hipotezinde şu şekilde gerçekleşir;

1.vuruş: Allelerden birinin kaybolması

2.vuruş: 1.vuruşla kaybolan bölgenin karşısına denk gelen bölgedeki mutasyonlarla veya örneğin promotör metilasyonu veya histon deasetilasyonu gibi transkripsiyonun sessizleştirilmesi aracılığıyla ikinci allelin inaktive edilmesi [3, 37].

Kanser gelişimi için tümör baskılayıcı genlerin her iki kopyasının da inaktive olması gerekir. Bu nedenle kromozomların büyük kayıpları genellikle tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu için bir koşuldur [3, 37].



**Şekil 3.2.** Knudson'un çift vuruş hipotezi [5]

Knudson'un çift vuruş hipotezini ortaya koymasından bu yana bu hipotez yeni aday tümör baskılayan genlerin bulunmasında kullanılmıştır. Bu hipotezde bahsi geçen LOH analizi kromozomlar üzerindeki mikrokayıpların bulunmasında kullanılan bir haritalama tekniği olmuştur. LOH analizi sonucunda kayıp sıklığının yüksek olduğu bölgelerdeki genler incelenerek kanserde tümör baskılayıcı gen olma özelliğine sahip genler belirlenebilir.

### 3.2.1. LOH Mekanizması

Heterozigotluk kaybı, birkaç farklı mekanizma ile meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar:

- 1.Delesyon
- 2.Gen değişimi
- 3.Tek veya çift homolog olmayan mitotik rekombinasyon
- 4.Translokasyon
- 5.Kromozom kırıkları veya kaybı [36]

### **3.2.2. Heterozigotluk Kaybının Belirlenmesinde Kullanılan Metotlar**

#### **3.2.2.1. Mikrosatellit Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR, Polymerase Chain Reaction (PCR))**

LOH analizi tümör baskılayıcı gen yakınlarındaki polimorfik markır kayıpları ile tanımlanmaktadır. LOH analizinde sıklıkla mikrosatellit PCR kullanılır. Mikrosatellitler genom boyunca dağılmış dinükleotitlerden veya trinükleotitlerden oluşan kısa düzenli tekrar dizileridir. Genellikle küçük ve belirli DNA dizileri olduğundan PCR ile çoğaltılabilirler. Bilgi vermeyen vaka sayısını azaltmak için popülasyonda yüksek oranda heterozigotluğa sahip olan markırları kullanmak önemlidir. Eğer hasta seğilen mikrosatellit lokusu için homozigot ise; PCR'dan sonra aynı büyüklükte mikrosatellit alleller oluşur ve kapiler elektroforezde tek pik, poliakrilamid jel elektroforezinde ise tek bant oluşmaktadır. Bu durum iki allelden birinin kaybolmadığını ve bu hastanın bu markır için bilgi verici olmadığını gösterir. PCR'dan sonra farklı büyüklükte alleller oluşursa ve kapiler elektroforezde iki pik, poliakrilamid jel elektroforezinde ise iki bant görülüyorsa bu o DNA'nın heterozigot olduğunu gösterir. Eğer normal doku DNA'sı kapiler elektroforezde iki pik, poliakrilamid jel elektroforezinde çift bant oluştururken tümörlü doku DNA'sı tek pik veya tek bant oluşturuyorsa bu tümörlü dokuda allellerden birinin kaybolduğunu gösterir [36]. Bu olaya heterozigotluk kaybı (LOH) denir.

#### **3.2.2.2. Karyotip analizi:**

Karyotip analizi gen delesyonlarının belirlenmesinde kullanılan metotlardan biridir. Kromozomal anormallikleri inceler. Karyotip analizi büyük delesyonları belirlemede iyi bir metottur fakat metafaz safhasındaki hücrelerle sınırlıdır ve küçük delesyonların belirlenmesinde yetersizdir [36].

### **3.2.2.3. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) :**

Floresan *in situ* hibridizasyon hem metafaz hem de interfaz aşamasındaki hücreler için tümör hücrelerindeki delesyonu belirlemede iyi bir metottur. Lokusa özel problemlerle hedef bölgelerdeki delesyonlar belirlenmektedir. Bu metot da küçük delesyonların tespit edilmesinde sınırlıdır [36].

### **3.2.2.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizm (RFLP) analizi:**

Bu metotta hedef gen bölgesi özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. PCR ürünleri tanınan DNA bölgesine özel restriksiyon enzimleri (RE) ile kesilir. LOH'un RFLP ile tespiti, incelenen gen kendi kodlama sırasıyla belirli bir RE tarafından tanınan bir DNA polimorfizmi içerdiğinde mümkün olabilir. Eğer hasta bu polimorfizm için heterozigot ise normal dokuda RFLP sonucu iki allel görülürken LOH olan hastalarda RFLP sonucu normal dokuda iki allel tümörlü dokuda tek allel görülür [36].

### **3.2.2.5. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) :**

SSCP analizi tek zincirli nükleik asitlerin elektroforetik olarak sekanslarındaki küçük farklılıklara göre ayrılmasıdır. Bu yöntemle tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür. Bu yöntemde kullanılan non-denaturan jellerde tek iplikçikli DNA'da oluşan değişimin jelde yürüme farklılığının belirlenmesine dayalı bir yöntemdir. Tümörlü ve normal dokuların PCR ürünlerinin SSCP analizi sonucu hedef gendeki LOH tespit edilebilmektedir [36].

## **3.3. Mesane Kanseri**

Mesane vücutta idrar depolamakla görevli kese şeklinde bir organdır. Mesane kanserinin evrelerinin daha iyi anlaşılabilmesi için mesanenin histolojisini bilmek gerekmektedir.

Mesane histolojik olarak mukoza - submukoza, müsküler tabaka ve seroza olmak üzere üç tabakadan oluşur [39].

1) Mukoza ve submukoza: Mukoza transizyonel (değişici) epitel hücreleri ile döşenmiştir. Değişici epitel hücreleri mesane boş iken 4-8, dolu iken 2-3 kat

hücreden oluşan tabakalar halinde dizilirler. Mesane boş iken oval ve kuboid yapıda olan hücreler, mesane dolunca basınç etkisiyle yassı epitele dönüşür [39].

Submukozal tabaka (lamina propria), mukozal bazal membran ile muskularis propriadenilen gerçek kas tabakası arasında uzanan, zengin bir damar ağı, lenfatik damarlar, elastik ve kollajen lifler içeren bağ dokusu tabakasıdır. Kalınlaşma değişken olup trigonve mesane boynunda genellikle incedir. İçerisinde damar ağına yakın seyreden düzenliveya düzensiz şekilde düz kas demetleri bulunur. Mesane tümör evrelemesinde bubölgede görülen tümörler bazen kas invazyonu yapmış izlenimi vererek yanlış evrelemeye neden olabilir. Bu lokalizasyondaki kas yapıları ile musküler tabakabirbirine karıştırılmamalıdır [39].

2) Musküler tabaka: İçte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyirli kas demetlerinden meydana gelir [39].

3) Seroza: Fibroelastik bir tabaka olup damarlar ve sinirler içerir. Çok sayıda yağ hücresi mevcuttur [39].

### **3.3.1. Mesane Kanserinin Epidemiyolojisi**

Mesane kanseri çok sık meydana gelen kanserlerden biridir. Gelişmiş ülkelerde beşinci, dünya genelinde dokuzuncu en yaygın kanserdir. Her yıl dünya genelinde yaklaşık 357.000 yeni vaka ve 145.000 ölüme neden olduğu hesaplanmaktadır [3, 40]. Ayrıca endüstrileşmiş ülkelerde ve Şistomiyasisin yaygın olduğu endemik bölgelerde mesane kanserine daha sık rastlanmaktadır [40].

Mesane kanserinin riski yaş ile birlikte artar. En fazla olarak 50-70 yaş arasında görülmektedir [2]. Çoğu popülasyonda mesane kanseri erkeklerde kadınlara oranla 3-4 kat daha fazla oranda görülür. Bu farkın temel nedenleri olarak erkeklerin kadınlara oranla daha fazla sigara içmeleri ve aromatik aminler gibi kimyasal maddelerle daha fazla temas halinde olmalarıdır ki aromatik aminler ve sigara mesane kanserinin başlıca nedenleri arasında gösterilmektedir [41]. Mesane kanseri aynı zamanda kentsel alanlarda kırsal alanlara göre daha fazla oranda görülür [42].

Transisyonel hücre karsinomu (TCC) her ne kadar histotip dağılımları farklı popülasyonlarda değişse de en sık rastlanan histotiptir. Amerika'da beyaz popülasyonda

mesane kanserlerinin %93'ü TCC iken bu ülkedeki siyahi popülasyonda bu oran %85'tir. Mısır'da ise TCC oranı çok daha düşüktür [41].

Her ne kadar Kuzey Afrika ve Batı Asya yüksek risk alanıysa da Avrupa ve Kuzey Amerika'da da yüksek insidans oranı bildirilmiştir. Avrupa'da erkeklerde yüksek insidans oranı Kuzey İtalya, İspanya ve İsviçre'de 100,000'de 30 iken Almanya, Birleşik Krallık ve Fransa'da ortalarında, çoğu Doğu ve Kuzey Avrupa ülkelerinde daha düşük oranlardadır. Ölüm oranı Danimarka, İtalya, Malta ve İspanyada 100,000'de 9 iken İsveç, Finlandiya ve İzlanda'da yaklaşık 100,000'de 4 olarak bildirilmiştir. Kadınlarda en yüksek ölüm oranı 100,000'de 2-3 ile Danimarka ve Birleşik krallıkta bildirilmiştir [41].

### **3.3.2. Mesane Kanserinin Histopatolojik Tipleri**

Mesane kanserinin başlıca üç histolojik tipi vardır [43, 44]. Bunlar:

1-Transisyonel hücreli karsinom: Ürotelyal karsinom da denir. Mesane kanserleri içinde diğerlerinden daha fazla oranda görülür, tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %90'ını oluşturur [43, 44].

2-Skvamöz hücreli karsinom: Bu tip daha az yaygındır ve genellikle invaziftir. Bu karsinom çeşidi tüm mesane kanserlerinin yaklaşık %5'ini oluşturur ve şistomiyasis, kateter yerleştirme, siklofosamid kemoterapi gibi kronik mesane irritasyonları durumunda daha yaygındır [43, 44].

3-Adenokarsinom: Daha az yaygın ve invaziftir. Bu karsinom, diğer sarkom benzeri lezyonlarla birlikte transisyonel hücre karsinomu ve skuamöz hücreli karsinomdan sonra geri kalan % 5'i oluşturur [43, 44].

### **3.3.3. Mesane Kanserinin Derecelendirilmesi ve Evrelendirilmesi**

#### **3.3.3.1. Derecelendirilmesi:**

Derece 1 veya G1 karsinoma: minimal hafif nükleer irileşme, normal veya hafif bozulmuş yapı ve mitoz içermeyen veya nadir mitotik figür gösteren, 7 hücre tabakasından fazla hücre içeren kalınlaşmış ürotelyumdan meydana gelir



Derece 2 veya G2 karsinoma: belirgin nükleer pleomorfizm, kaba kümelenen kromatin ve normal yapısının bir miktar bozulmasını gösterir.

Derece 3 veya G3 karsinoma: son derece belirgin nükleer değişiklikler gösterir. Hücre sayısında artış, polaritenin bozulması, hücre boyutunda düzensizlik, bazaldan yüzeyel mukozaya kadar diferansiyasyonunun yokluğu, kromatin paterninde farklılık, artmış mitotik figürler ve nadiren tümör dev hücrelerinin varlığı olarak tanımlanan hücresel anaplazi derece 3 karsinomanın karakteristik özellikleri arasındadır [1].

### **3.3.3.2. Evrelendirme:**

Histolojik evrelendirme tümör-lenf nodu-metastaz TNM evreleme sistemi ile olur.

#### **PRİMER TÜMÖR (T) :**

T0: Primer tümörün kanıtı yok.

Ta: Non-invaziv papiller karsinom.

Tis: Karsinom in situ.

T1: Tümör subepitelyalkonnektif dokuya (lamina propria) invaze.

T2: Tümör yüzeyel kas tabakasına invaze.

T3:T3a: Tümör derin kas tabakasına invaze.

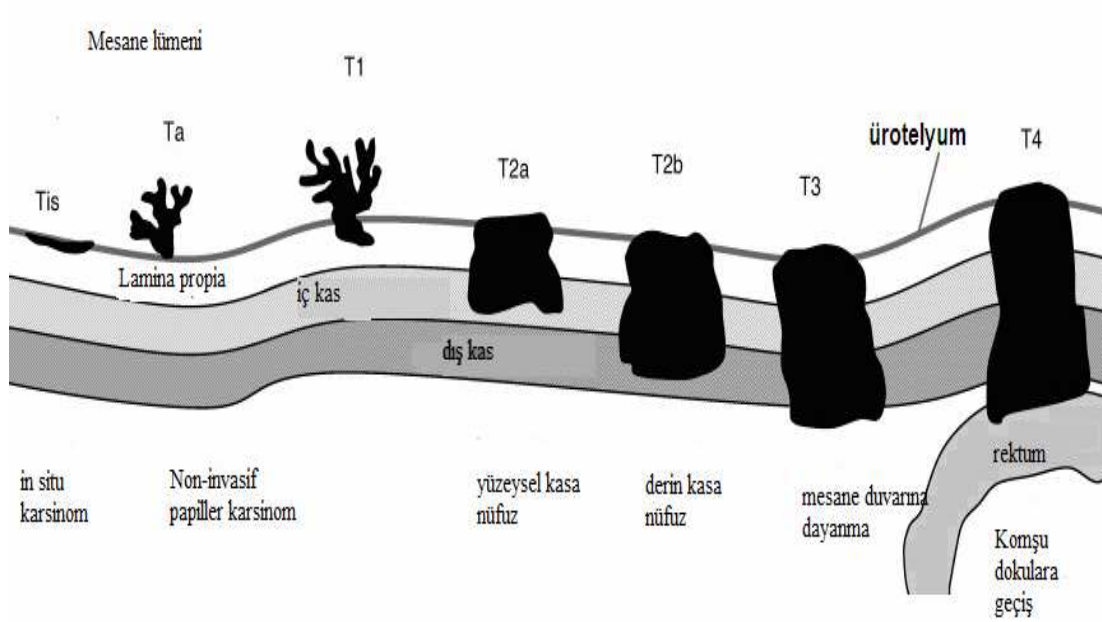
T3b: Tümör perivezikal yağ tabakasına invaze.

T4: Tümör prostat, uterus, vajina, pelvik duvarı veya abdominal duvara invaze [45].

Mesane tümörlerinin diaagnozundaki histopatolojileri ile ilgili olarak farklı davranışlar gösterdikleri kabul edilmektedir [46].

Mesane kanserlerinin çoğunluğu (%70-80) yüzeysel mesane kanserleridir. Bunlar düşük derecelidir ve epitelyal bazal membrana nüfuz etmezler. Bu tür tümörler evre Ta olarak tanımlanırlar. İn situ karsinomdaki lezyonlar kesinlikle yüzeyseldirler ve epitelyuma kötü diferansiye (yüksek derece) olmuşlardır. Bunlar yüksek riskli

lezyonlar olarak kabul edilirler. Kas invazyonu ilerlemesi yaygın değildir. Kas invazif tümörler genellikle papiller tümör hikayesi olmayan hastalarda tanı konulur. Bunlar kasa nüfuz edebilir (T2), mesane duvarının ötesine (T3) veya komşu hücrelere (T4) geçebilir [46].



**Şekil 3.3.** Mesane kanserinin evreleri [46]

LENF NODU (N) :

NO: Bölgesel lenf nodu metastazı yok.

N1: En büyük çapı 2 cm veya daha küçük olan bir tane metastatik lenf nodu.

N2: Çapı 2 cm'den büyük, ama 5 cm'den küçük bir tane metastatik lenf nodu veya hiçbirisinin çapı 5cm'den büyük olmayan çoklu lenf nodu metastazı.

N3: En büyük çapı 5cm'den büyük lenf nodu metastazı [45].

UZAK METASTAZ (M)

M0: Uzak metastaz yok.

M1: Uzak metastaz var [45].

### 3.3.4. Mesane Kanserinin Nedenleri

Kansere yol açan maddelere karsinojen denir ve bunlar gerek deney hayvanları üzerinde gerekse insan topluluklarında kanserlerin rastlanma sıklığını inceleyen epidemiyolojik çalışmalarla belirlenmiştir. Tümörlerin gelişimi çok aşamalı bir işlem olduğundan birçok değişik faktör kanserin ortaya çıkma olasılığını etkileyebilir. Bu yüzden bir tek maddeyi kanserin nedeni olarak göstermek mümkün değildir [4].

#### 3.3.4.1. Çevresel Etmenler

Sigara içimi ve mesane kanseri arasındaki ilişkiyi araştırmak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların ortak sonucu mesane kanseri ile sigara içimi arasında bir ilişkinin var olduğudur [2, 47, 48, 49].

Sigara dumanıyla birlikte vücuda pek çok kimyasal alınmaktadır. Bu nedenle sigara içiminin mesane kanseri mekanizması üzerindeki etkisi kesin olarak bilinmemektedir, fakat bu kimyasallardan 2-naftilamin ve 4-aminobifenil en şüpheli iki kimyasal ajan olarak görülmektedir. Sigaradaki bileşiklerin mesane üzerindeki karsinojenik etkilerinin yanında, mesane epitelindeki hiperplazi temel alınarak sigara içiminin proliferasyonu arttırdığı bulunmuştur [48].

Diğer tütün ürünleri ve mesane kanseri arasında henüz bir bağlantı bulunamamıştır. Diğer tütünlerin de sigara tütünü ile yaklaşık aynı içeriğe sahip olması nedeniyle pipo ve puro gibi diğer tütün alışkanlıklarının biyolojik olarak mesane kanserine yol açması olasıdır [48].

Genel olarak mesane kanseri erkeklerde kadınlara oranla üç kat daha fazla görülmektedir [3, 41]. Mesane kanseri görülme riski yaşla beraber artmaktadır [3].

Yapılan çalışmalarda mesane kanseri ile aile öyküsü arasında bir ilişkinin olduğu tespit edilmiş olup mesane kanserine yakalanan bireylerin ailelerinde de kanser öyküsüne rastlanmıştır [50].

İdrar yolu hastalıkları da mesane kanseri için bir risk faktörüdür. Örneğin şistomiasis *Schistosoma haematobium*'un neden olduğu bir idrar yolu hastalığıdır ve bu hastalığın mesane kanseri insidansını belirgin ölçüde arttırdığı bildirilmiştir. [28, 51].

Pek çok çalışma meyve ve sebze tüketiminin mesane kanseri riskini azalttığını göstermiştir. Aşırı sıvı alımı da mesane kanseri riskini azaltmaktadır, çünkü üriyasyonu arttırmakta, dolayısıyla da mesane epiteli ve karsinojenlerin birbirleriyle temas süresini azaltmaktadır. Fakat klorlu su içenlerde mesane kanseri riskinin artabileceği, arsenikle kirlenmiş içenlerde ise kesinlikle mesane kanserinin artacağı bildirilmiştir [41].

Mesane kanseri riski ile kahve tüketimini araştıran yaklaşık 30 kadar çalışmada kahve içenlerde kahve içmeyenlere oranla daha fazla mesane kanseri riski taşıdıklarını göstermiştir. Fakat bu çalışmalarda kahvenin dozu ve süresi ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır [41].

Sigara içiminden sonra, meslek faktörü de mesane kanseri için en büyük ikinci risk sayılmaktadır. Aromatik aminler üretimi, renk maddesi üretimi, boyama, plastik üretimi, alüminyum endüstrisi, deri endüstrisi gibi alanlarda çalışanlarla kamyon çalışanları ve diğer şoförlerde mesane kanserine daha sık rastlanmaktadır [41].

**Tablo 3.2:** Mesane kanserine neden olduğu tahmin edilen çevresel etmenler/koşullar ve maruz kalma şekilleri [44]

Etken/Koşul	Maruz Kalma		
	Mesleksel	Tıbbi	Sosyal
<b>Alkilleyici maddeler:</b>			
Siklofosfamid		+	
<b>Aromatik aminler:</b>			
4-Aminodifenil	+		
Benzidin	+		
2-Naftilamin	+		
Kloronafazin		+	
İyonize radyasyon	+	+	
<b>Etkenle karşılaşma durumları:</b>			
Baca temizleyiciliği	+		
Alüminyum ürünlerin kullanımı	+		
Kömür katmanı damıtma	+		

Etken/Koşul	Maruz Kalma		
	Mesleksel	Tıbbi	Sosyal
Boyacılık	+		
Asfaltlama ve çatı izolasyonu	+		
Kauçuk endüstrisi	+		
Saç boyayıcılığı	+		
<b>Parazitler:</b>			
<i>Schistosoma haematobium</i>			+
Sigara dumanı			+
Pasif sigara içiciliği			+

### 3.3.4.2. Genetik Faktörler

Mesane kanserine neden olan genetik etmenlerin başında tümör baskılayıcı genlerin inaktifleşmesi ve onkogenlerin aktifleşmesi gelmektedir [3].

Yüzeysel düşük dereceli mesane kanseri, yüksek dereceli ve kas invazif mesane kanserinden daha farklı bir yolağa sahiptir. Düşük dereceli papiller tümörler sıklıkla PGFR3 ve HRAS proto-onkogen aktivasyonunu göstermektedir [52].

Çoğu kas invazif tümörler, önceden var olan ürotelyal karsinom in situ, yüksek dereceli intraepitelyal neoplazmdan kaynaklanır ve sıklıkla TP53, RB ve PTEN tümör baskılayıcı genlerdeki değişimleri gösterir. Bununla birlikte bu tümörler çoğu karyotip değişimini ortaya koyarlar ve büyük olasılıkla onkogen veya tümör baskılayıcı genlerdeki ek mutasyonlar in situ tümörlerden invazif tümörlere dönüşümde rol oynar [52].

Birçok çalışmada, bilinen onkogen ve tümör baskılayıcı genlerin durumları belirlenmiş ve mesane kanserindeki yeni genomik olayları tanımlamak için yaygın kromozomal değişiklikler araştırılmıştır. Çoğu çalışma tüm derece ve evreleri içeren tümörlerin bir serisini tanımlamıştır [46].

**Tablo 3.3:** Transiyonel hücre karsinomunda bilinen genlerin genetik ve epigenetik değişiklikleri [46]

Gen (sitogenetik lokasyonu)	Değişiklikler	Frekans/Klinik ilişki
<b>ONKOGENLER</b>		
HRAS (11p15) /NRAS (1p13) /KRAS2 (12p12)	Mutasyonla aktifleşme	Tüm derece ve evrelerde %10-15
FGFR3 (4p16)	Mutasyonla aktifleşme	Ağırlıklı olarak düşük derece ve evrelerde %30-80
ERBB2 (17q)	Amplifikasyon/ Aşırı ekspresyon	Yüksek derece ve evrelerde %10-14'ünde amplifiye
CCND1 (11q13)	Amplifikasyon/ Aşırı ekspresyon	Tüm derece ve evrelerde %10-20
MDM2 (12q13)	Amplifikasyon/ Aşırı ekspresyon	Yüksek derecede %4 amplifikasyon; düşük derece, aşırı ekspresyon ~%30
E2F3 (6p22)	Amplifikasyon/ Aşırı ekspresyon	Tümör hücre çizgilerinde amplifikasyon ve T1 ve daha üst tümörlerde %11
<b>TÜMÖR BASKILAYICI GENLER</b>		
RASSF1A (3p21)	Metilasyon	Tümünde %62 ; yüksek derece; ilerleme
FHIT (3p14)	Delesyon/Metilasyon	İn vitro ürotelyal transformasyon esnasında delesyon; çoğu kas invazif, tümünde %40 LOH; %61 ekspresyon düşüşü; %16 metilasyon
CDCKN2A (9p21)	Homozigot delesyon/Metilasyon /Mutasyon	Yüksek derece ve evre %20-30; tüm derece ve evrelerde LOH %60; in vitro ölümsüzleşme
PTCH (9q22)	Delesyon/Mutasyon	Tüm derece ve evrelerde %60 LOH; düşük mutasyon frekansı
DBC1 (9q32-33)	Delesyon/Metilasyon	Tüm derece ve evrelerde %60 LOH
TSC1 (9q34)	Delesyon/Mutasyon	Tüm derece ve evrelerde %60 LOH; ~%13 mutasyon
PTEN (10q23)	Homozigot delesyon /Mutasyon	Kas invazifte %30-35 10q LOH; Yüksek derecede %17 mutasyon
RB1 (13q14)	Delesyon/Mutasyon	Overall %10-15, kas invazif %37
TP53 (17p13)	Delesyon/Mutasyon	Kas invazif %70

**Tablo 3.4:** Transiyonel hücre karsinomunda LOH analizi ile belirlenen yaygın delesyon bölgeleri [46]

Sitogenetik lokasyon	Frekans (%)	Klinik parametrelerle ilişkisi
3p	48	Evrelerde
4p	22	Hiçbiri
4q	24	Yüksek derece ve evre
8p	23	Yüksek derece ve evre
9q	60	Hiçbiri
11p	40	Derece
11q	15	Hiçbiri
14q	10-40	Evre

**Tablo 3.5:** Transiyonel hücre karsinomunda yaygın bulunan kromozomal değişiklikler [46]

Tümör evresi	Kayıplar	Eklèmeler	Amplifikasyonlar
Ta	9p, 9q, 10q, 11p, Y	1q, 17, 20q	11q
T1	2q, 4p, 4q, 5q, 6q, 8p, 9p, 9q, 10q, 11p, 11q, 13q, 17p, 18p, 18q, Y	1q, 3p, 3q, 5p, 6p, 8q, 10p, 17q, 19p, 19, 20p, 20q	1q22-24,3p24-25, 6p22, 8p12, 8q22, 10p12-14, 10q22-23, 11q13, 12q12-21, 17q21, 20q13
T2-4	T1+15q	pT1+7q, Xq	pT1

Mesane kanserlerinde en sık görülen LOH kromozom 9'dadır. Kromozom 9'daki LOH mesane tümörlerinde derece ve kademe ne olursa olsun yaklaşık %50 ve üzerinde bulunmuştur. LOH kritik bölgeleri hem 9p hem de 9q'da haritalandırılmıştır [46]. Kromozom 9q'daki LOH transiyonel hücre karsinomunda (TCC) en sık rastlanan genetik değişikliktir ve bu 9q'da mesane kanseri ile ilgili bir veya daha fazla tümör baskılayıcı genin varlığına işaret eder [26]. Yapılan çalışmalar sonucunda 9p'de bir bölge (9p21) ve 9q'da en az üç bölge (9q22, 9q32-q33 ve 9q34)'de kayıp bölgeleri haritalandırılmıştır. Bu bölgeler için aday genler 9p21'de

CDKN2A/ARF (p16/p14ARF) ve CDKN2B (p15), 9q22'de PTCH, 9q32-q33'te DBC1 ve 9q34'te TSC1'dir [46].

11p'deki heterozigotluk kaybı pTa tümörlerinin bazılarını kapsayan mesane tümörlerinin %40'ında bulunmuştur fakat yüksek dereceli ve evreli tümörlerde daha yaygındır. 11p üzerinde önerilen hedef CDKN1C'dir (p57<sup>KIP2</sup>) [46].

Karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (CHG) ile 1q, 17 ve 20q'da artma, 11q amplifikasyonu ve 10q kaybını içeren diğer kopya sayısı değişiklikleri tespit edilmiştir, fakat bunların hiçbirisi sık değildir [46].

11q amplifikasyonu Rb yolağı üzerinden G1 ve S fazlarında hücre döngüsünün düzenlenmesinde yer alan siklin D1 genini (CCD1) içerir [46].

Kromozom 13q'nun yeniden düzenlenmesi ve delesyonları mesane kanserinde yüksek sıklıkla görülür ve Rb geninin inaktive olması ile ilişkilendirilir [52].

Kromozom 17p13'te TP53 lokusunda mutasyonlar ve delesyon ürotelyal karsinom in situ'de sıklıkla meydana gelir. TP53'teki mutasyon sadece onun fonksiyonunu bozamaz fakat immünohistokimyasal olarak saptanan p53 proteininin çekirdekte birikmesine neden olarak normal ubiquitinasyonu engeller. Yapılan çalışmalarda p53 mutasyonu ve çekirdekte birikmesi arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiş olmasına rağmen çoğu çalışmada çekirdekte birikmenin mutasyona bağlı olmadan da gerçekleşebileceği düşünülmektedir. Diğer p53 hedef proteinlerinin mesane kanserinin prognozunda ve progresyonunda önemli bir rol oynadıkları görülmektedir [52].

Mesane kanseri yaşamın geç yıllarında ortaya çıktığı için birçok kalıtsal değişimin tümör gelişimi için gerekli olduğunu düşündürmektedir. Bu yüzden diağnozda büyük tanı gruplarını temsil eden düşük dereceli pTa'da çok az genetik değişikliklerin tanımlanması şaşırtıcıdır. Düşük dereceli pTa tümörleri genetik olarak stabildir [46].

Mesane kanserinde en heyecan verici bulgu FGF reseptör 3 geninin mutasyonudur. Mutasyonlar genelde ürotelyal papillomda bulunmuştur [46].



HRAS mesane kanseri hücre hatlarında ilk tanımlanan onkogen olmasına rağmen HRAS mutasyonu ve mesane kanseri arasında kesin bir ilişki belirlenmemiştir. HRAS mutasyon sıklığı %0 ile 84 arasında değişmektedir. HRAS mutasyonu tümöröenez için çok önemli olmasa da RAS yolu özellikle FGFR3 gibi tirozin kinaz reseptör aktivitesini artırılmasında önemli bir rol oynar. FGFR3'teki aktivasyon mutasyonları yüzeysel mesane kanserlerinin yüksek bir kısmında ve invazif mesane kanserlerinin az bir kısmında rastlanmıştır [52].

Yüzeysel transiyonel hücre karsinomunda FGFR3 mutasyonu gibi invazif tümörlerde tanımlanan çoğu olayda MAPK ve/veya PI3-kinaz yolağı aktive olabilir. ERBB2 (17q23), EGFR gen ailesinin bir tirozin kinaz reseptörüdür. Bu invazif ürotelyal hücre karsinomasının %10-50'sinde aşırı eksprese olur. Ras genleri bazı invazif ürotelyal hücre karsinomalarda mutasyona uğramıştır. İnsan tümör hücrelerindeki in vitro deneyler HRAS'ın, EGFR ekspresyonunu arttırdığını ve invazif fenotipe neden olduğunu göstermektedir [46].

Mesane kanserlerinde seyrek olarak (%4-6) MDM2 gen (12q14) amplifikasyonunu görülür. İmmünohistokimyasal olarak MDM2 proteinin aşırı ekspresyonu mesane kanserlerinin %20-30'unda bildirilmiştir. MDM2, p53 seviyesini belirlerken onun aşırı ekspresyonu p53 fonksiyonunu inaktive edebilen alternatif bir mekanizmayı temsil eder [46].

MYC geninin mesane kanserinde aşırı eksprese olduğu gösterilmiştir. MYC ürününün ekspresyonunun tümör derecesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [53]. Fakat bunun mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Her ne kadar 8q'nun yüksek düzey amplifikasyonu bazı invazifürotelyal hücre karsinomalarda bulunsa da MYC bunlar için hedef olarak görünmemektedir [46].

ERB-B2 (HER-2/neu) onkogen ürününün ekspresyonuna mesane kanserinde sık sık rastlanmaktadır. Bu gen ürününün aşırı ekspresyonu artan tümör derecesi ile ilişkilidir [53].

Mesane tümörleri ve hücre çizgilerinde 6p'de tanımlanan mutasyonlar E2F3genini kapsar. Kas invazif ürotelyal hücre karsinomlarında yaklaşık %14'ü E2F3

amplifikasyonuna sahiptir. E2F transkripsiyon faktör ailesi yedi gen içerir, bu genlerin birkaçı etkileşim içindedir ve Rb ile düzenlenir [46].

TP53, RB, p21 ve p16'daki değişikliklerin birikimi birçok çalışmada gösterilmiştir. Bir çalışmada tümör örnekleri p53, RB veya p21 değişimi ile karakterize edilmiştir. Bu çalışmalar değerlendirildiğinde sonuç olarak TP53 ve RB bozulması hücre döngüsü regülasyonu ve hücre sağ kalımındaki görevleri doğrultusunda invazif mesane kanserinde önemli bir rol oynadığına dair güçlü kanıtlar sunulmaktadır [52].

## BÖLÜM 4

### MATERYAL VE YÖNTEM

#### 4.1. Materyal

Bu çalışmada, yirmi beş mesane kanserli hastaya ait sağlıklı ve tümörlü doku örneği kullanıldı.

##### 4.1.1. Cihazlar ve kimyasallar

-DNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya), Derin dondurucu (ALASKA), Spektrofotometre (Nanodrop, Amerika), PCR (Gene Amp, PCR System 9700, Amerika), Vorteks (Elektro-mag, Türkiye), Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye), Yatay elektroforez sistemi (Bio-rad, Amerika), Güç Kaynağı (Bio-rad, Amerika), Hassas terazi (OHAUS, Amerika), Jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Fransa), pH metre (Hanna, Amerika), Dikey elektroforez sistemi (Bio-rad, Amerika), Isıtıcı manyetik karıştırıcı (Elektro-mag, Türkiye) ve balıklar, Çalkalayıcı (Selecta, İspanya), 1000 µl'lik, 200 µl'lik, 100 µl'lik ve 10 µl'lik mikropipet (Ependorf, Almanya), 10X Buffer (Fermentas, Kanada), MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Kanada), Na<sub>2</sub>EDTA (Merck, Almanya), Tris (Vivantis, Malezya), Agaroz (Vivantis, Malezya), Etidyum bromür (Merck, Almanya), İzopropil alkol (Amresco, Amerika), Tris Base (Vivantis, Malezya), Borik asit (Merck, Almanya), EDTA (Merck, Almanya), Akrilamid (Vivantis, Malezya), Bisakrilamid (Vivantis, Malezya), APS (Vivantis, Malezya), TEMED (Vivantis, Malezya), Kristalize üre (Amresco, Amerika), Gümüş nitrat (Merck, Almanya), Sodyum karbonat (Amresco, Amerika), Sodyum tiosülfat (Amresco, Amerika), Formaldehit (Merck, Almanya), Glasiyel asetik asit (Merck, Almanya), 1000µl'lik, 200µl'lik endorf PCR tüpleri (Greiner bio-one), Steril 1000 µl'lik, 200 µl'lik, 100 µl'lik ve 10 µl'lik mikropipet uçları (Greiner bio-one), Mezür, beher, steril cam pipetler, puar, dNTP (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) (Fermentas, Kanada), Primer(3'-5')(Sigma).

## 4.2. Yöntem

### 4.2.1. DNA İzolasyonu:

Yirmi beş mesane kanserli hastanın sağlıklı ve tümörlü dokularından taze örnekler alınmıştır. Alınan bu taze dokulardan Qiagen DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA'lar izole edilmiştir.

### 4.2.2. DNA'ların Hazırlanması:

-Elde edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

-Spektrofotometrik ölçüm sonuçlarına göre DNA'lardan 50ng/μl olacak şekilde 50μl çözelti hazırlanmıştır.

-Kullanılan DNA'ların spektrofotometrik ölçümleri ve hazırlanma ölçüleri Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1:** İzole edilen DNA'ların spektrofotometrik ölçüm sonuçları ve konsantrasyonlarının 50ng/μl'a seyreltilmesi için gerekli DNA ve ddH<sub>2</sub>O miktarı

DNA örneği	Spektrofotometrik ölçüm sonucu (ng/μl)	Çözeltiye eklenen DNA miktarı (μl)	Çözeltiye eklenen ddH <sub>2</sub> O miktarı (μl)	Toplam çözelti hacmi (μl)
1N	63, 88	39, 14	10, 86	50
1T	59, 60	41, 95	8, 05	50
2N	23, 05	100	-	100
2T	13, 72	200	-	200
3N	61, 13	40, 9	9, 1	50
3T	54, 11	46, 2	3, 8	50
4N	41, 29	60	-	60
4T	201, 89	12, 4	37, 6	50
5N	83, 29	30	20	50
5T	132, 82	18, 8	31, 2	50
6N	86, 05	29	21	50
6T	86, 23	29	21	50
7N	79, 44	31, 47	18, 53	50
7T	213, 62	11, 8	38, 2	50
8N	94, 31	26, 5	23, 5	50

DNA örneği	Spektrofotometrik ölçüm sonucu (ng/µl)	Çözeltiliye eklenen DNA miktarı (µl)	Çözeltiliye eklenen ddH2O miktarı (µl)	Toplam çözelti hacmi (µl)
8T	81,42	30,7	19,3	50
9N	58,67	42,6	7,4	50
9T	41,09	60	-	60
10N	32,30	70	-	70
10T	37,92	70	-	70
11N	34,74	70	-	70
11T	99,96	25,1	24,9	50
12N	239,34	10,4	39,6	50
12T	48,16	55	-	55
13N	21,31	150	-	150
13T	109,44	22,8	27,2	50
14N	75,76	33	17	50
14T	73,81	33,9	16,1	50
15N	50,68	50	-	50
15T	174,63	14,3	35,7	50
16N	165,82	15	35	50
16T	149,18	16,76	33,24	50
17N	12,32	250	-	250
17T	10,7	250	-	250
18N	9,46	250	-	250
18T	10,05	250	-	250
19N	31,1	70	-	70
19T	84,65	29,5	20,5	50
20N	77,38	32,3	17,7	50
20T	331,89	7,5	42,5	50
21N	55,85	44,8	5,2	50
21T	34,02	70	-	70
22N	46,9	60	-	60
22T	219,19	11,4	38,6	50
23N	626,37	3,9	45,1	50
23T	227,79	11	39	50
24N	264,46	9,5	40,5	50
24T	195,63	12,7	37,3	50
25N	349,54	6,4	43,6	50
25T	287,8	8,7	41,3	50

#### 4.2.3. Primerlerin Hazırlanması:

##### Gerekli çözeltiler:

- 1) 1M Tris çözeltisi
- 2) 0,5M EDTA çözeltisi
- 3) 10: 1 Stok TE çözeltisi
- 4) 1:0,1 TE çözeltisi

##### Hazırlanışı:

-Liyofilize gelen primerler steril ddH<sub>2</sub>O ile 100 pmol/μl olacak şekilde sulandırılmıştır.

--Elde edilen çözelti -20°C saklanmıştır.

-Kullanımdan önce primerler çiftler halinde alınarak 1:0,1 TE çözeltisi ile sulandırılmıştır.

#### 4.2.4. PCR:

##### 4.2.4.1. PCR’da kullanılan primerler

**Tablo 4.2:** PCR’da kullanılan primerler, dizilimleri ve PCR ürün büyüklüğü

Primer Adı	Primer Dizilimi	PCR ürün büyüklüğü (bp)
D4S2909	İleri 5'-AGTGGCCATCTGTATTGGTC-3'	246-252
	Geri 5'-CAACTGCTACNCTTACCTTTC-3'	
D4S1647	İleri 5'-TATTTCCAACACCCCTGCTA-3'	132-152
	Geri 5'-AAGCAAAGAGGATTGAAAGTG-3'	
D4S1564	İleri 5'-GAATGCTCTCCAGTTACTGATAAAG-3'	132
	Geri 5'-AAACCGTGGCAAAGGAAATAAAAAC-3'	
D4S2623	İleri 5'-AACTAGGCTGCTTCCCAGAT-3'	200-241
	Geri 5'-GCCAGATACATGGCTAAGGA-3'	
D4S406	İleri 5'-GAAAGGCAGAGTCATAACAGGAAG-3'	205

Primer Adı		Primer Dizilimi	PCR ürün büyüklüğü (bp)
	Geri	5'-TAAGGATAGAGTGATTCCAAGAAAG-3'	
D4S407	İleri	5'-ATAATATCCTTTGATCCTTTCGCTA-3'	111-135
	Geri	5'-AAATTTGGTTATTTTTAAGCAAAC-3'	
D4S402	İleri	5'-TACTGTGTTGCCCAAGGTGCTC-3'	221
	Geri	5'-ACAAGGCTTTGGATTAATTTTGTCC-3'	
D4S2394	İleri	5'-ACTGGTATGTCCTAACCC-3'	253-254
	Geri	5'-GATCTGCAGTTGGATTCTGG-3'	
D4S1644	İleri	5'-TAACATTGACCGCTCCTCTC-3'	186-206
	Geri	5'-CATCCTTCCTGGTCCCTAGT-3'	
D4S1625	İleri	5'-GACTCCAAATCACATGAGCC-3'	182-210
	Geri	5'-GTCTCTGCATTTGCTGGTTT-3'	
D4S2979	İleri	5'-TTTCTGCAGCTACCATGAAT-3'	141-161
	Geri	5'-TAGTTTGCCAACCCCTAGTC-3'	
D4S408	İleri	5'-GGTCTGATGAAAATGTTCTCAAGC-3'	229-243
	Geri	5'-TAGACTGGGTTGTTAGGGACTCTC-3'	
D4S1652	İleri	5'-AATCCCTGGGTACATTATATTTG-3'	138-150
	Geri	5'-CAGACATTCTTTATTCTTTACCTCC-3'	

İzole edilen DNA (50ng/μl) 'lar için kullanılan örnek PCR protokolü:

**Tablo 4.3:** PCR protokolü

Toplam	20 (μl)
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.5
10XBuffer	2.5
dNTP	2
Primer F (20 pmol)	1
Primer R (20 pmol)	1
Taq polimeraz (1000 unit)	0.1
DNA örneği	*1, 5
dH <sub>2</sub> O	**11.4

\*spekrofotometrik ölçüm sonucu 50ng/μl'nin altında bulunan DNA'lar ölçüm sonuçlarına göre PCR çözeltisine 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 μl gibi değişken oranlarda konulmuştur.

\*\*konulan DNA oranında su PCR çözeltisinden çıkarılmıştır.

Her primerin kendine özel bir bağlanma sıcaklığı vardır. Bu çalışmada kullanılan primerler 52°C ile 60°C arasında değişen sıcaklıklarda reaksiyona girmektedir. Her primerin bağlanma sıcaklığı Tablo 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.4:** Her primere özel PCR'da kullanılan sıcaklıklar

<b>D4S2909</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü	<b>D4S1647</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4		İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5		Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>60</b>	1		Bağlanma	<b>54</b>	1	
Uzama	72	0,5		Uzama	72	0,5	
Final	72	7	Final	72	7		
<b>D4S1564</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü	<b>D4S2623</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4		İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5		Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>56</b>	1		Bağlanma	<b>56</b>	1	
Uzama	72	0,5		Uzama	72	0,5	
Final	72	7	Final	72	7		
<b>D4S406</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü	<b>D4S407</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4		İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5		Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>58</b>	1		Bağlanma	<b>60</b>	1	
Uzama	72	0,5		Uzama	72	0,5	
Final	72	7	Final	72	7		



<b>D4S402</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>60</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S2394</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>56</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S1644</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>56</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S1625</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>52</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S2979</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>56</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S408</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>58</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S1652</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>56</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

<b>D4S1652</b>	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	35 döngü
İlk denaturasyon	94	4	
Denaturasyon	94	0,5	
Bağlanma	<b>56</b>	1	
Uzama	72	0,5	
Final	72	7	

#### **4.2.5. %2'lik Agaroz Jel Elektrofözezi**

-2 gr agaroz 100 ml 1X TBE içerisinde çözdürüldü.

-Mikrodalga fırın içerisinde 3 dk 700W'ta homojenize olması için kaynatılıp içine %1'lik 10 µl etidyum bromür eklendi. Jel tabağına dökülüp üzerine taraklar yerleştirildi.

-Tank 1XTBE ile jelin üzerini kaplayacak şekilde dolduruldu.

-PCR ürünlerine yükleme boyası eklendi (5µl örnek 5µl orange G boyası) ve jel üzerindeki kuyucuklara yüklendi.

-100 V'da DNA'lar 30 dakika yürütüldü.

#### **4.2.6. %7'lik Denatüre Poliakrilamid Jel**

##### **4.2.6.1. Gerekli çözeltiler**

-% 40 Akrilamid çözeltisi

-% 2 Bis-akrilamid çözeltisi

-% 10 Amonyum persülfat (APS)

-10 x TBE çözeltisi

-TEMED (N, N, N', N'-tetramethylenediamine)

-Üre

##### **4.2.6.2. Jelin Hazırlanması**

- %7'lik denatüre poliakrilamid jel hazırlanırken bir erlenmayer içersine aşağıdaki sıra ile çözelti ve kimyasallar eklendi.

Üre	15 g
% 2 Bis-akrilamid	6ml
% 40 Akrilamid	5,7ml
10 X TBE Çözeltisi	3ml
ddH <sub>2</sub> O	2damla

- Bu karışım manyetik karıştırıcıda 55°C'de eritildi.

-Toplam hacim 30 ml oluncaya kadar ddH<sub>2</sub>O eklendi.

-Daha sonra bu karışımın üzerine 200µl (%10) APS and 20µl TEMED eklendikten sonra camların arasına dolduruldu. Hazırlanan çözelti camların üzerine çıkıncaya kadar doldurduktan sonra taraklar iki cam arasına yerleştirilip 2 saat polimerizasyon işlemi gerçekleşinceye kadar beklendi.

#### **4.2.6.3. Camlar, Aralayıcılar ve Tarakların Temizlenmesi**

Camlar, aralayıcılar ve taraklar iyice yıkandıktan sonra izopropil alkol ile silindi.

#### **4.2.6.4. Örneklerin Hazırlanması**

PCR örneklerinden 2 µl alınarak 5µl yükleme boyası bir tüpte karıştırıldı. Daha sonra 94°C'de 5dk denatüre edildi ve +4°C'ye soğutulduktan sonra jele yüklendi.

#### **4.2.6.5. Sistemin hazırlanması**

Polimerize olan jel poliakrilamid dikey elektroforez kabinine yerleştirildi. Elektroforez tankı jelin alt ve üst kısmına temas edecek şekilde 1X TBE ile dolduruldu. Daha sonra hazırlanan PCR ürünleri yüklendi ve 400V'da primer büyüklüğüne göre 4-7 saat arasında yürütüldü.

#### **4.2.7. Gümüş nitrat boyama**

##### **4.2.7.1. Gümüş nitrat boyamada kullanılan çözeltiler**

-%10'luk asetik asit çözeltisi

-%1'lik gümüş nitrat çözeltisi

-10gr/ml sodyum tiyosülfat çözeltisi

-%3'lük sodyum karbonat çözeltisi

#### **4.2.7.2. Gümüş Nitrat boyamanın aşamaları**

-Yürütülen jel iki camın arasından çıkarılarak 250 ml %10'luk asetik asit çözeltisi içine konuldu. Çalkalayıcı üzerinde 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda asetik asit döküldü.

-Asetik asit muamelesinden sonra jelin üzerine 250 ml distile su konularak çalkalayıcı üzerinde 3 dakika tutuldu. Daha sonra su döküldü ve bu işlem iki kez daha tekrarlandı.

-Yıkama işleminden sonra %1'lik gümüş nitrat çözeltisi eklendi ve çalkalayıcı üzerinde 50 dakika tutuldu.

-Gümüş nitrat boyamadan sonra jel dikkatlice 3 defa distile su ile yıkandı.

-Jel, çalkalayıcıda %3'lük sodyum karbonat çözeltisinde 2-5 dakika tutuldu.

-Bantlar görünür hale gelince sodyum karbonat çözeltisi döküldü ve jel, distile su ile bir kez yıkandı.

-Yıkama işleminden sonra jel çalkalayıcıda %10'luk asetik asit çözeltisinde 10 dakika bekletildi.

-Hazır hale gelen jeller distile su ile yıkandı. Daha sonra asetat kağıtlarının arasına alındı.

#### **4.2.8. Sonuçların Değerlendirilmesi**

Gümüş boyama ile poliakrilamid jel üzerindeki DNA'lar görünür hale getirildikten sonra görüntüler bilgisayara aktarıldı. Bantların yoğunluğu image-J programı ile hesaplandıktan sonra aynı hastaya ait normal dokudan elde edilen sonuç ile tümörlü dokudan alınan sonuç kendi arasında orantılanmıştır. Bu işlem sonucunda elde edilen değerlerden 0,75 ile 1,25 arasındaki değerler normal kabul edilirken 0,75'ten küçük değerler ve 1,25'ten büyük değerler LOH kabul edilmiştir.

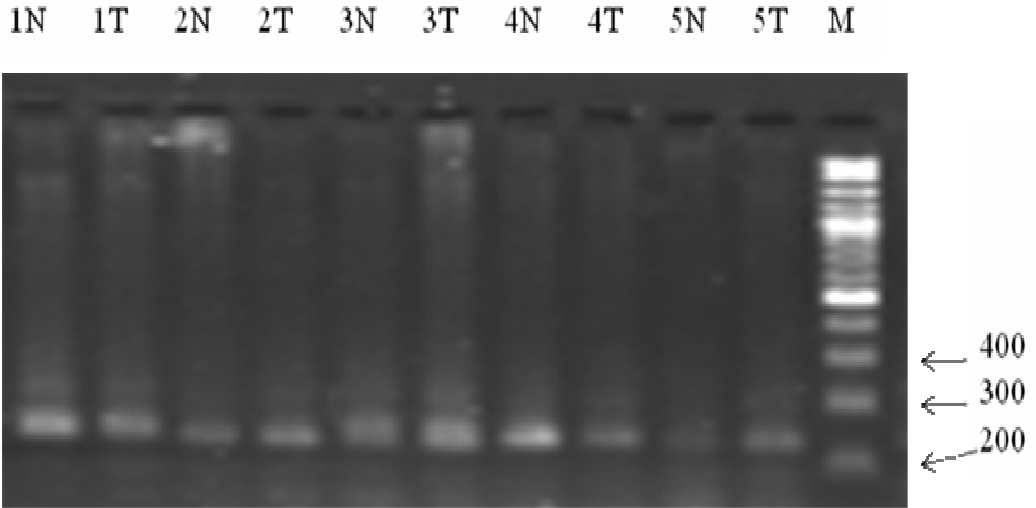
## BÖLÜM 5

### BULGULAR

#### 5.1. PCR Sonuçlarının Agaroz Jel Elektroforezinde Değerlendirilmesi

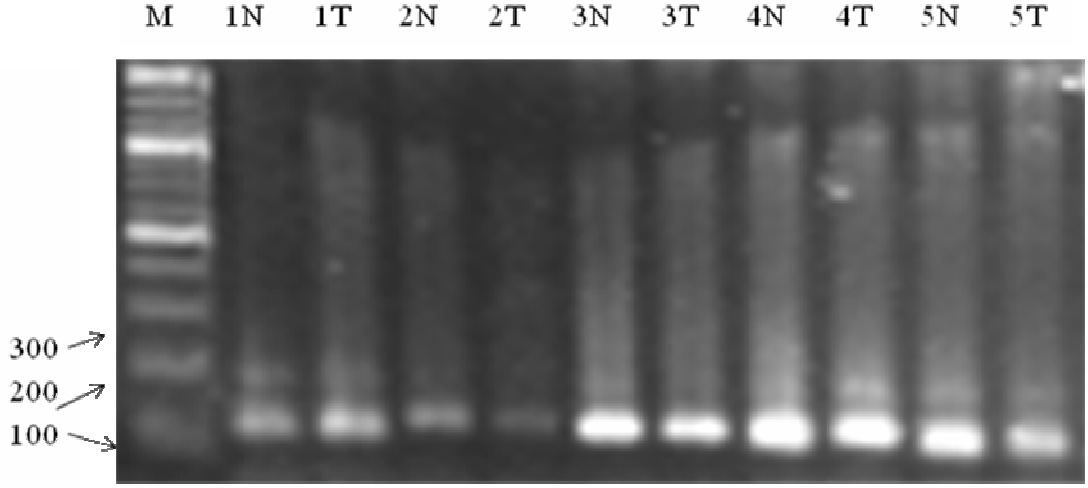
Bu çalışmada 25 mesane kanserli hastaya ait sağlıklı ve tümörlü taze dondurulmuş doku örneği kullanılmıştır. Bu örneklerden izole edilen DNA'lar kromozom 4q22-35 bölgesindeki heterozigotluk kaybının araştırılması amacıyla bu bölgeye özel 13 polimorfik markır (D42909, D4S1647, D4S1564, D4S2623, D4S406, D4S407, D4S402, D4S2394, D4S1644, D4S1625, D4S2909, D4S408 ve D4S1652) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır.

D4S2909 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 246-252 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.1'deki görüntü ortaya çıkmıştır.



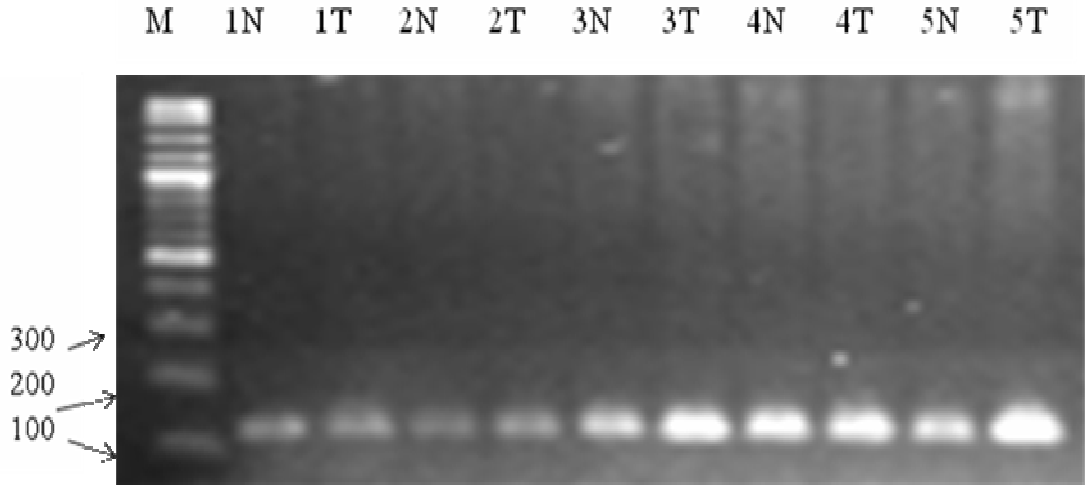
**Şekil 5.1.** D4S2909 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S1647 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 132-152 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.2'deki görüntü ortaya çıkmıştır.



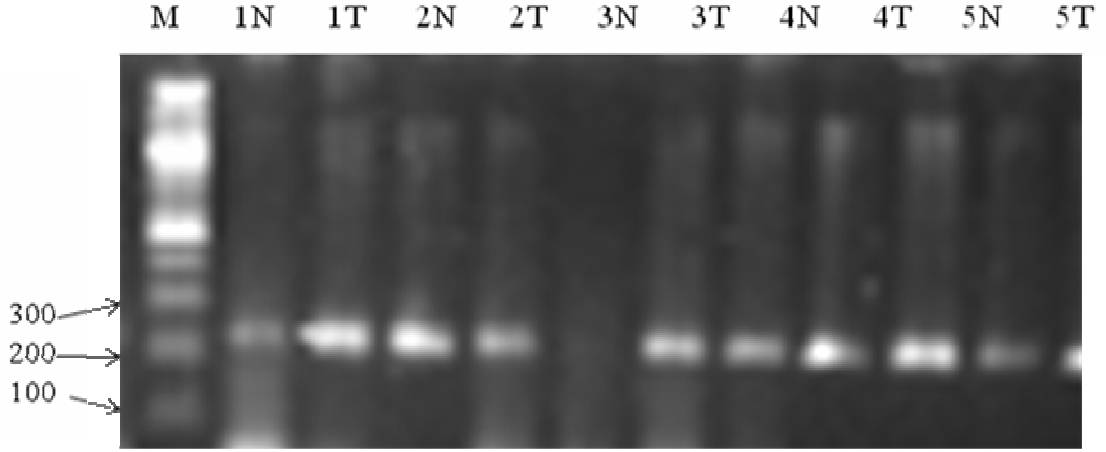
**Şekil 5.2.** D4S1647 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S1564 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 132 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.3'teki görüntü ortaya çıkmıştır.



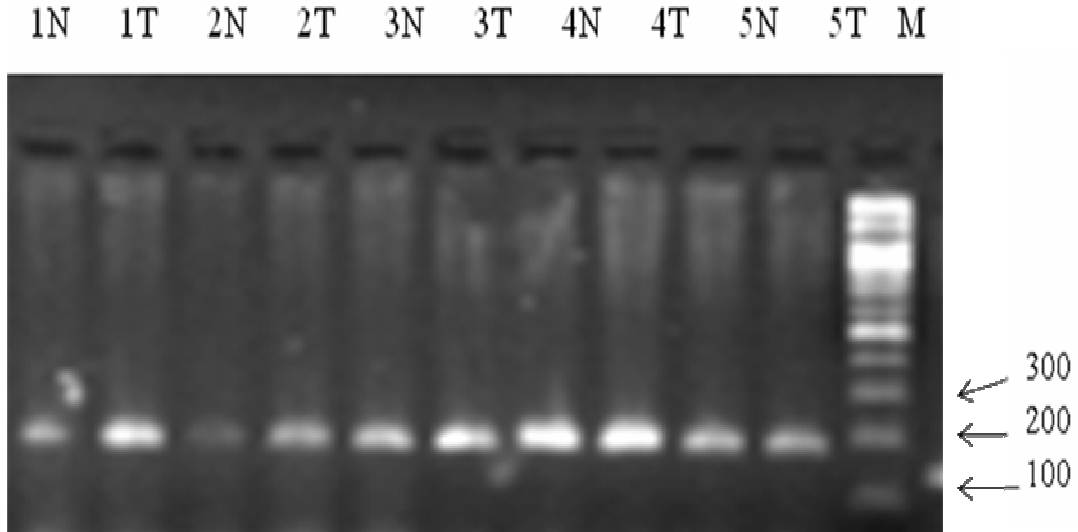
**Şekil 5.3.** D4S1564 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S2623 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 200-241 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.4'teki görüntü ortaya çıkmıştır.



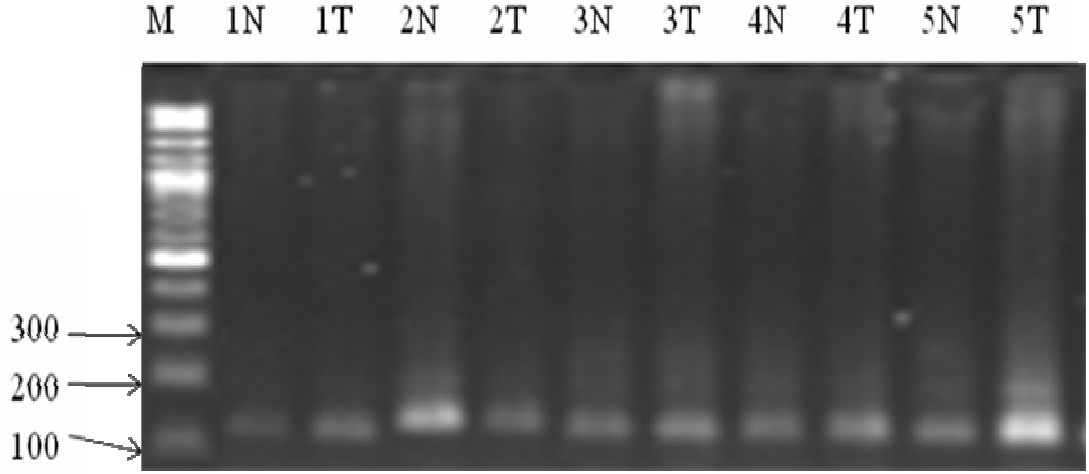
**Şekil 5.4.** D4S2623 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S406 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 205 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.5'deki görüntü ortaya çıkmıştır.



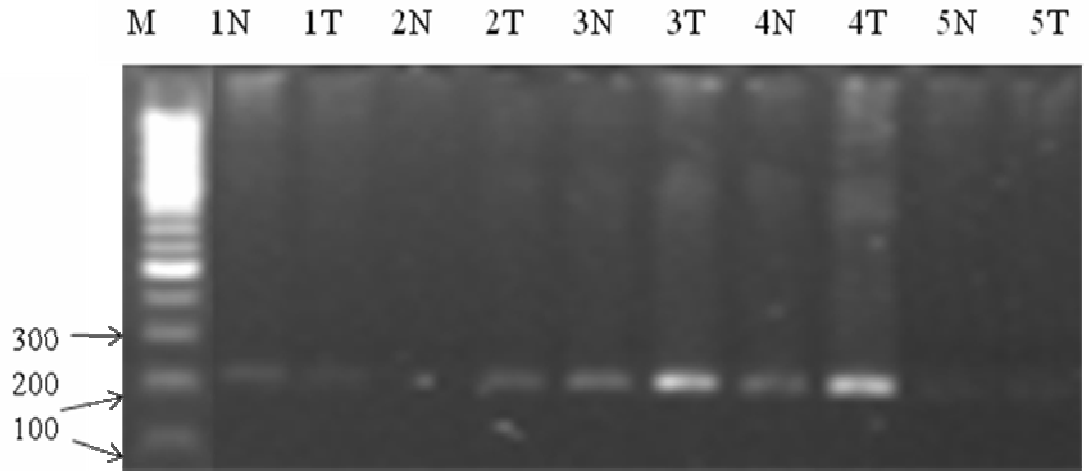
**Şekil 5.5.** D4S406 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S407 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 111-135 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.6'daki görüntü ortaya çıkmıştır.



**Şekil 5.6.** D4S407 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

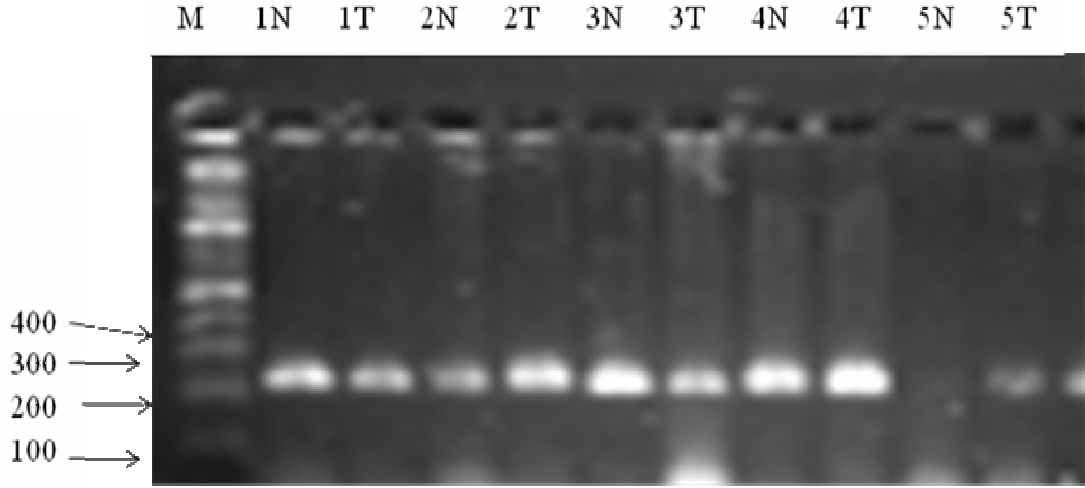
D4S402 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 221 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.7'deki görüntü ortaya çıkmıştır.



**Şekil 5.7.** D4S402 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

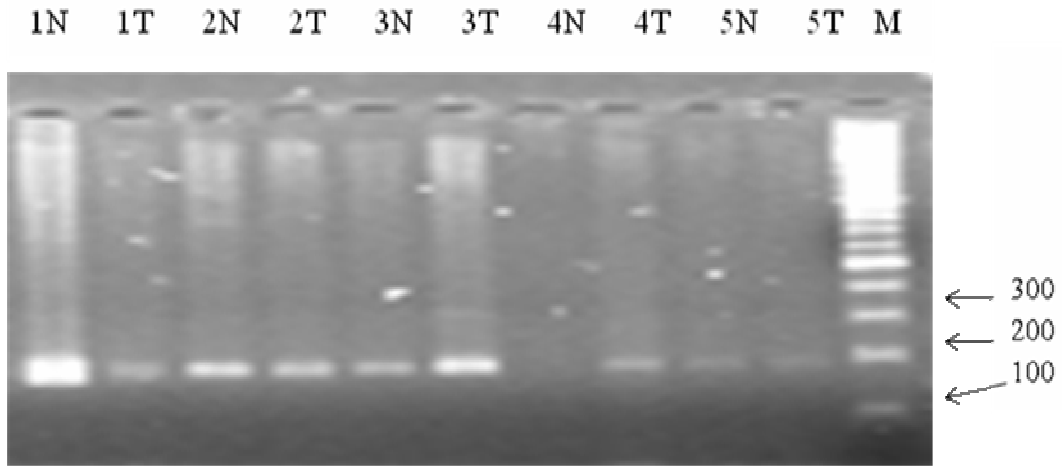
D4S2394 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 253-254 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.8'deki görüntü ortaya çıkmıştır.





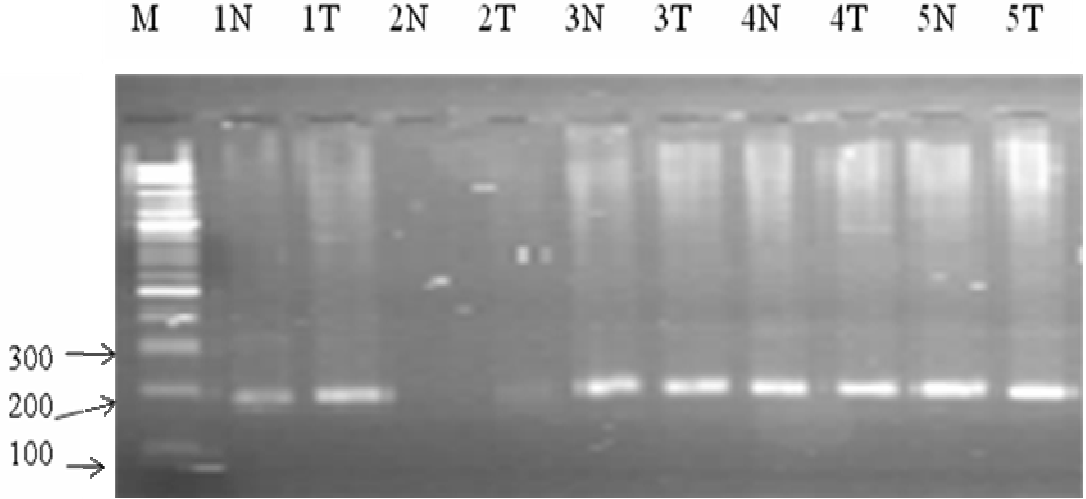
**Şekil 5.8.** D4S2394 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S1644 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 186-206 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.9'daki görüntü ortaya çıkmıştır.



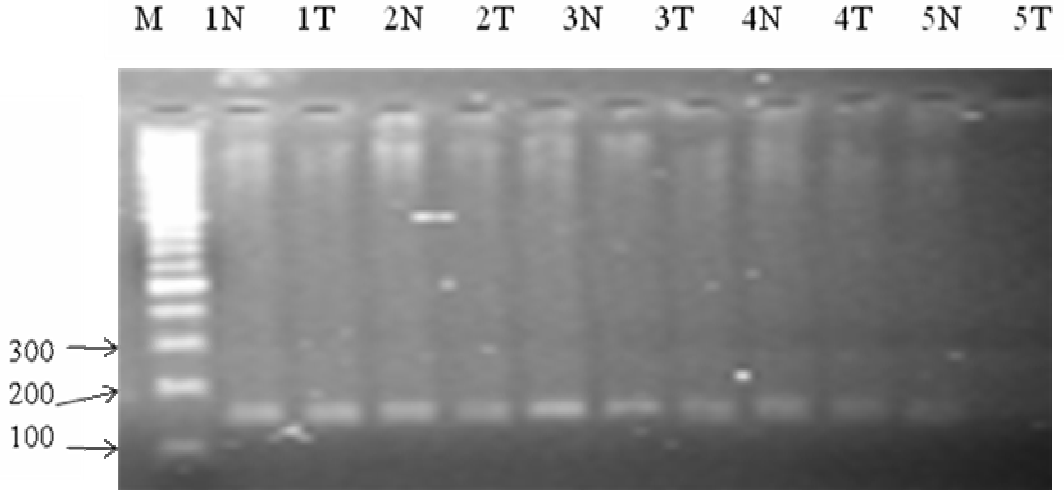
**Şekil 5.9.** D4S1644 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S1625 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 182-210 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.10'daki görüntü ortaya çıkmıştır.



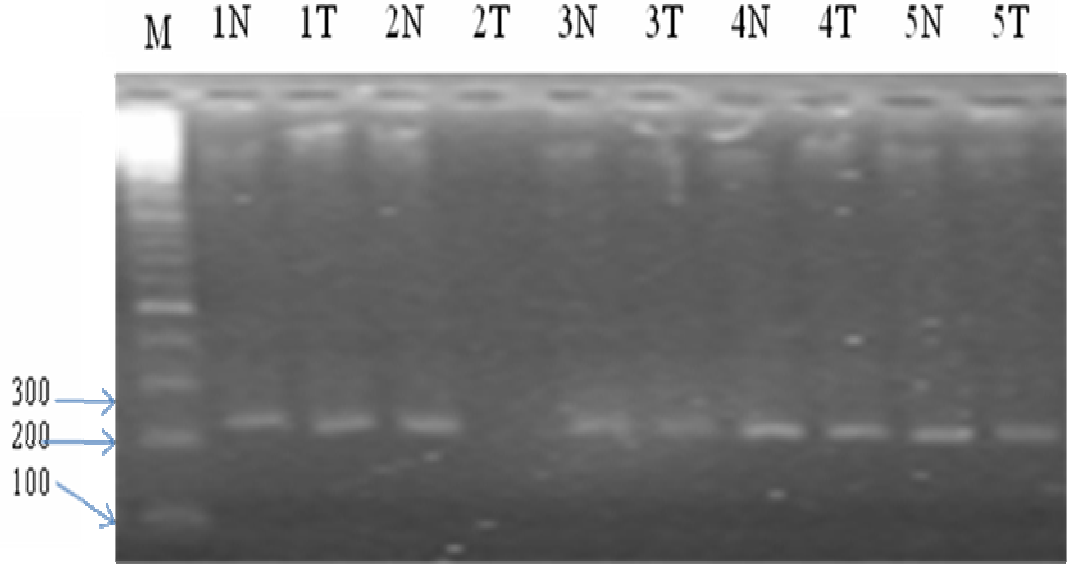
**Şekil 5.10.** D4S1625 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S2979 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 141-161 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.11'deki görüntü ortaya çıkmıştır.



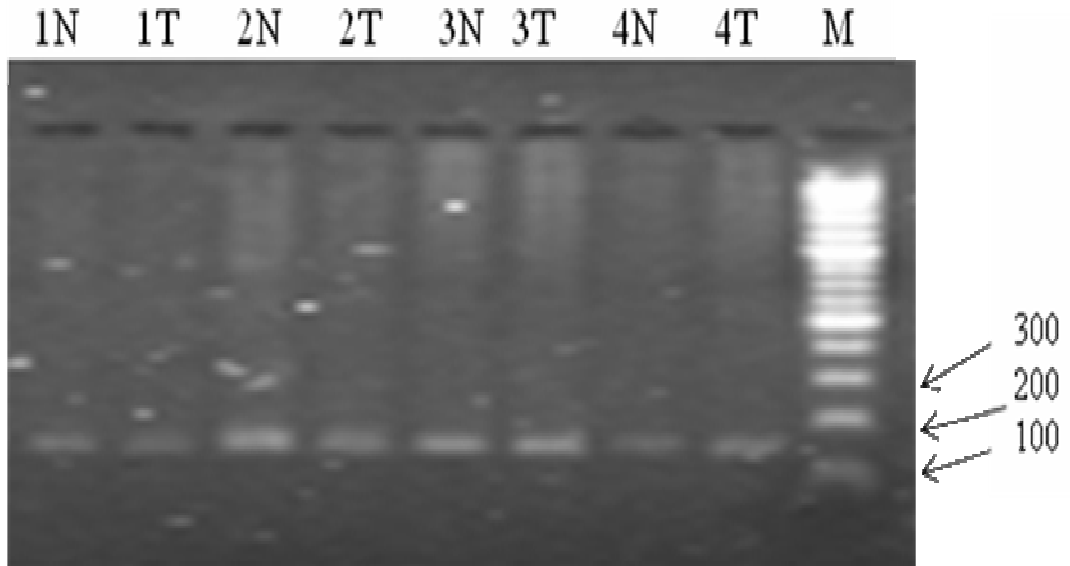
**Şekil 5.11.** D4S2979 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S408 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 229-243 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.12'deki görüntü ortaya çıkmıştır.



**Şekil 5.12.** D4S408 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4, 5: örnek numaraları)

D4S1652 nolu markır ile yapılan PCR sonucu 138-150 bp büyüklüğünde ürünler elde edilmiş ve agaroz jel elektroforezi sonucunda Şekil 5.13'teki görüntü ortaya çıkmıştır.



**Şekil 5.13.** D4S1652 nolu markırın PCR'ı sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel görüntüsü (M: Markır, N: Normal doku, T: tümör doku, 1, 2, 3, 4: örnek numaraları)

## 5.2. LOH Analizi

PCR ürünlerinin agaroz jelde kontrol edilmesinin ardından PCR ürünleri aynı hastaya ait normal ve tümörlü dokuların kıyaslanması amacıyla %7'lik poliakrilamid jelde yürütülmüş ve bantların görünür hale gelmesi için gümüş nitrat ile boyanmıştır.

### 5.2.1. D4S2909 nolu Markır Bulguları

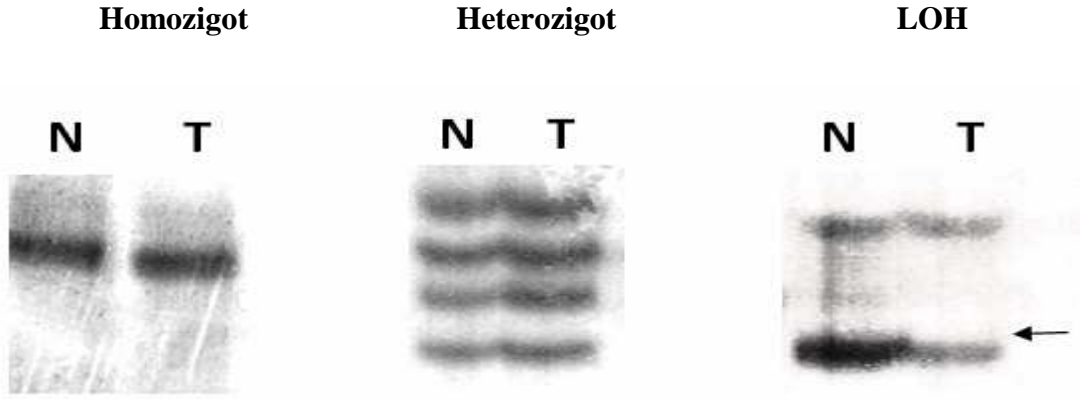
D4S2909 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 6'sında D4S2909 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 6 hastanın sadece 1'inde (%16,6) LOH tespit edilmiştir. D4S2909 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.14'te verilmiştir.



**Şekil 5.14.** D4S2909 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

### 5.2.2. D4S1647 nolu Markır Bulguları

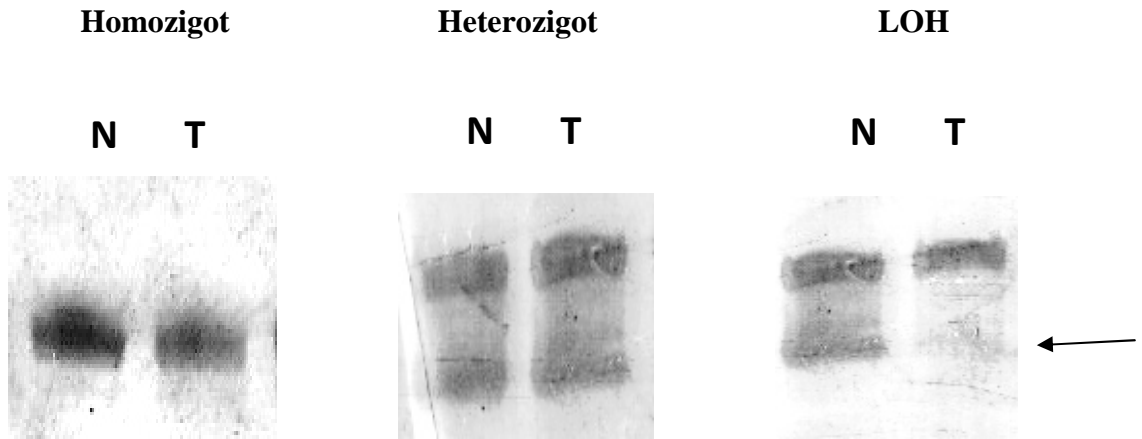
D4S1647 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 20'sinde D4S1647 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 20 hastanın 7'sinde (%35) LOH tespit edilmiştir. D4S1647 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.15'de verilmiştir.



**Şekil 5.15.** D4S1647 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

### 5.2.3. D4S1564 nolu Markır Bulguları

D4S1564 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 12'sinde D4S1564 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 12 hastanın 8'inde (%66,7) LOH tespit edilmiştir. D4S1564 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.16'da verilmiştir.

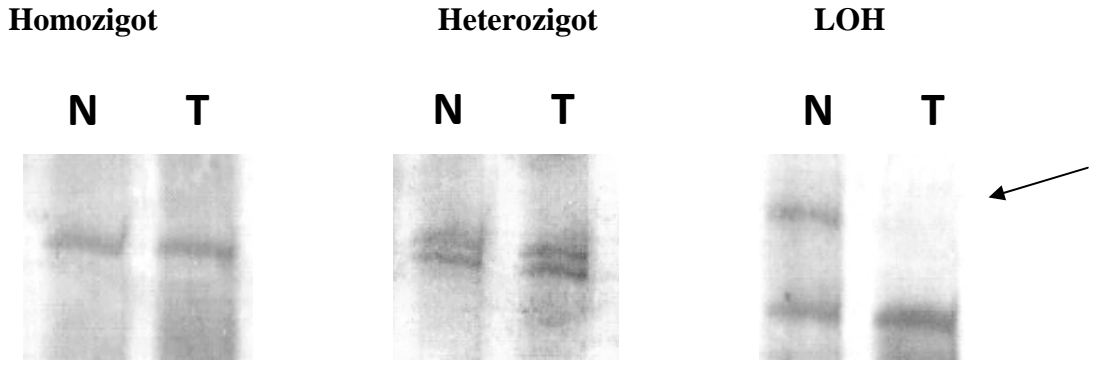


**Şekil 5.16.** D4S1564 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

### 5.2.4. D4S2623 nolu Markır Bulguları

D4S2923 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 15'inde D4S2623 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 15 hastanın 7'sinde (%46,7) LOH tespit

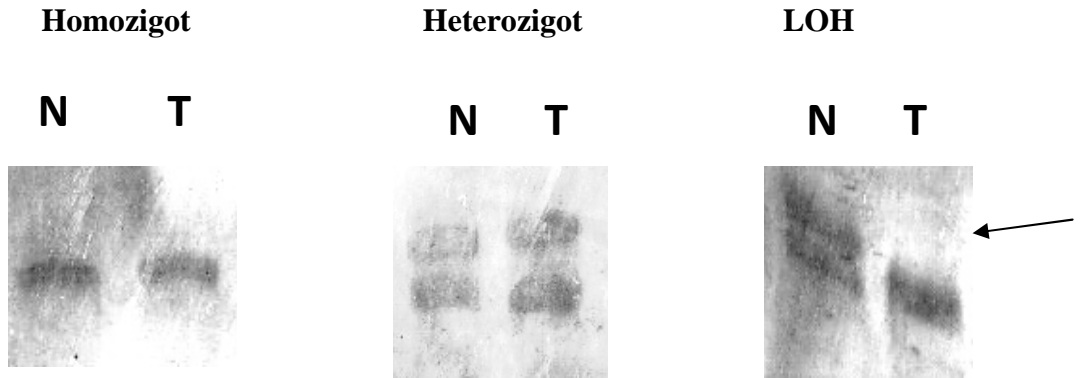
edilmiştir. D4S2623 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.17'de verilmiştir.



**Şekil 5.17.** D4S2623 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

#### 5.2.5. D4S406 nolu Markır Bulguları

D4S406 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 7'sinde D4S406 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 7 hastanın 3'ünde (%42,8) LOH tespit edilmiştir. D4S406 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.18'de verilmiştir.

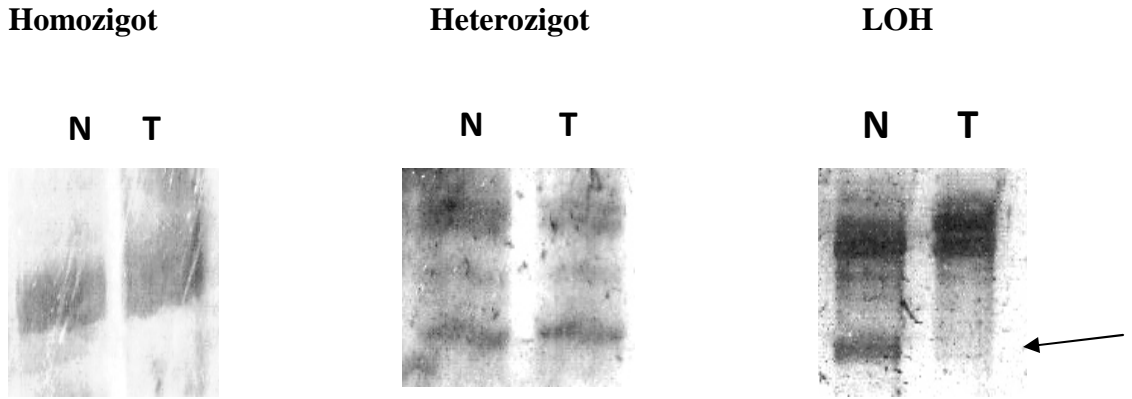


**Şekil 5.18.** D4S406 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

#### 5.2.6. D4S407 nolu Markır Bulguları

D4S407 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 6'sında D4S407 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 6 hastanın sadece 1'inde (%16,6) LOH

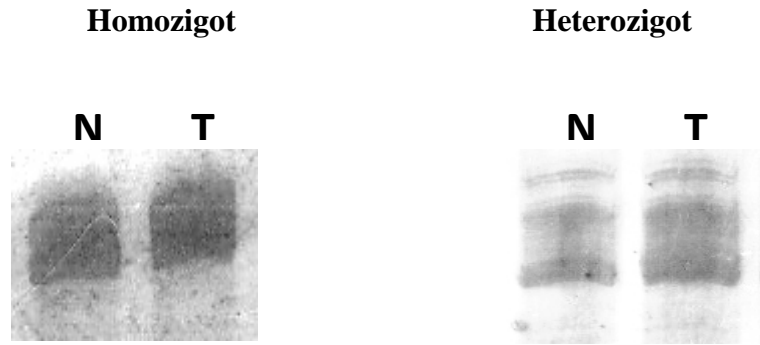
tespit edilmiştir. D4S407 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.19'da verilmiştir.



**Şekil 5.19.** D4S407 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

#### 5.2.7. D4S402 nolu Markır Bulguları

D4S402 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 10'unda D4S402 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 10 hastanın hiçbirinde (%0) LOH tespit edilmemiştir. D4S402 bölgesindeki heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.20'de verilmiştir.

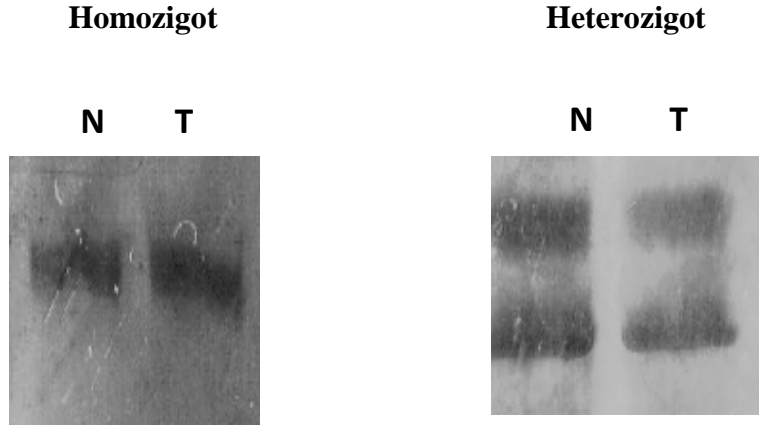


**Şekil 5.20.** D4S402 markırına ait homozigot, heterozigotluğun resmi (N: Normal, T: Tümör)

#### 5.2.8. D4S2394 nolu Markır Bulguları

D4S2394 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 5'inde D4S2394 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk

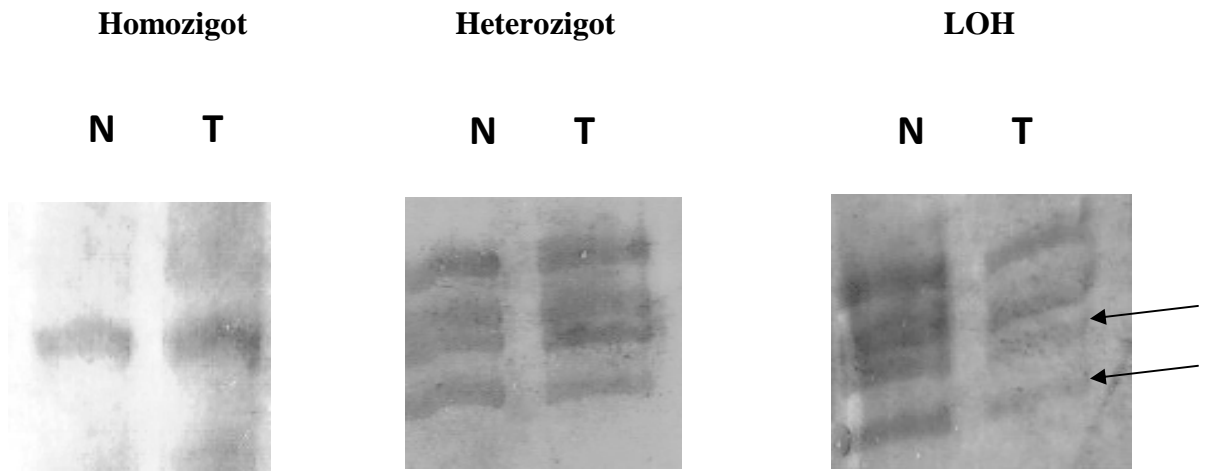
tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 5 hastanın hiçbirinde (%0) LOH tespit edilmemiştir. D4S2394 bölgesindeki heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.21'de verilmiştir.



**Şekil 5.21.** D4S2394 markırına ait homozigot, heterozigotluğun resmi (N: Normal, T: Tümör)

#### 5.2.9. D4S1644 nolu Markır Bulguları

D4S1644 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 17'sinde D4S1644 markırının yerleştiği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 17 hastanın 8'inde (%47,) LOH tespit edilmiştir. D4S1644 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.22'de verilmiştir.



**Şekil 5.22.** D4S1644 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)



### 5.2.10. D4S1625 nolu Markır Bulguları

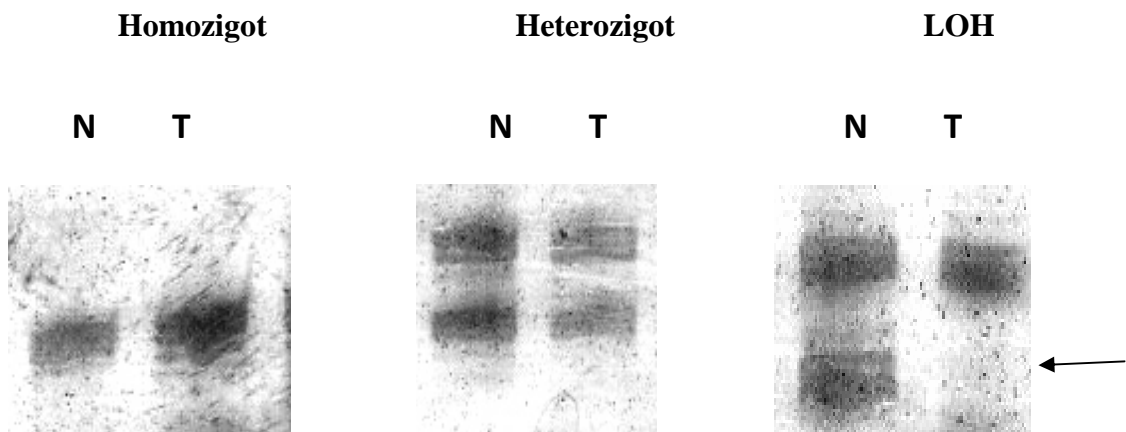
D4S1625 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastanın hiçbirinde D4S1625 markırın yerleştıği bölgede heterozigotluğa rastlanmamıştır. D4S1625 homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları şekil 5.23'de verilmiştir.



şekil 5.23. D4S1625 markırına ait homozigot resmi (N: Normal, T: Tumor)

### 5.2.11. D4S2979 nolu Markır Bulguları

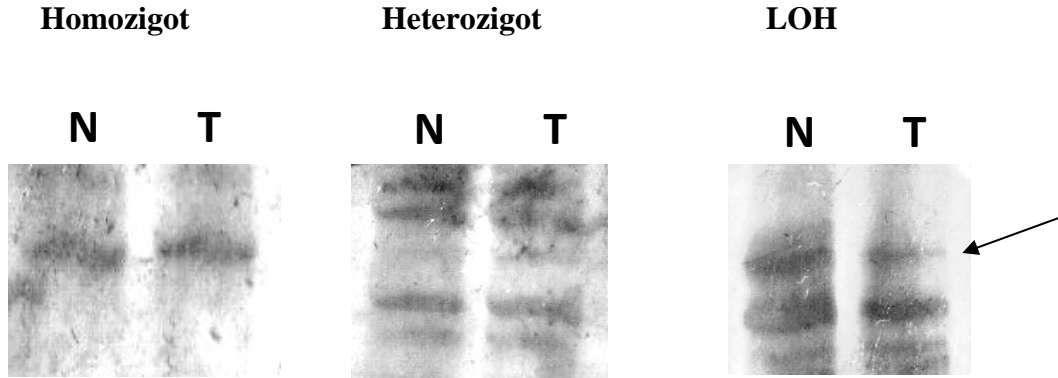
D4S2979 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 17'sinde D4S2979 markırının yerleştıği bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 17 hastanın 9'unda (%52,9) LOH tespit edilmiştir. D4S2979 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları şekil 5.24'te verilmiştir.



şekil 5.24. D4S2979 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tumor)

### 5.2.12. D4S408 nolu Markır Bulguları

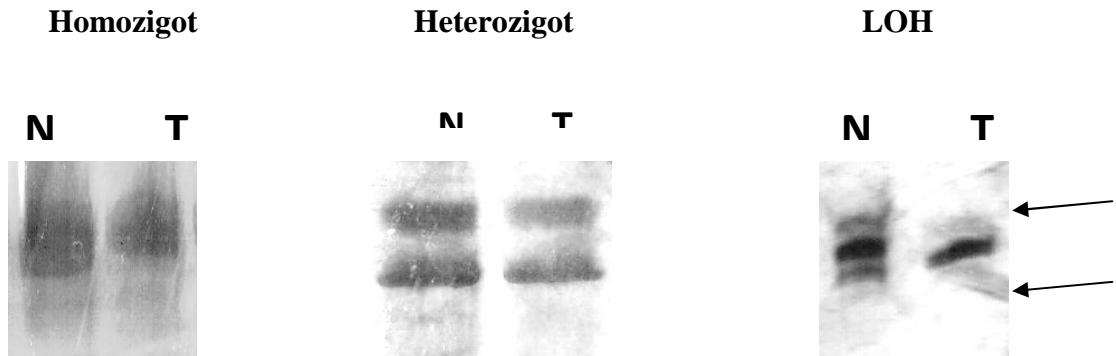
D4S408 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 15'inde D4S408 markırının yerleştığı bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 15 hastanın 7'sinde (%46,7) LOH tespit edilmiştir. D4S408 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.25'de verilmiştir.



Şekil 5.25. D4S408 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

### 5.2.13. D4S1652 nolu Markır Bulguları

D4S1652 4. kromozomun uzun kolunda bulunan bir markırdır. Bu çalışmaya dahil edilen 25 hastadan 15'inde D4S1652 markırının yerleştığı bölgede heterozigotluk tespit edilmiştir. Heterozigotluk gözlenen bu 15 hastanın 5'inde (%33, 3) LOH tespit edilmiştir. D4S1652 bölgesindeki LOH, heterozigotluk ve homozigotluk gözlenen hasta DNA'larına ait poliakrilamid jel fotoğrafları Şekil 5.26'da verilmiştir.



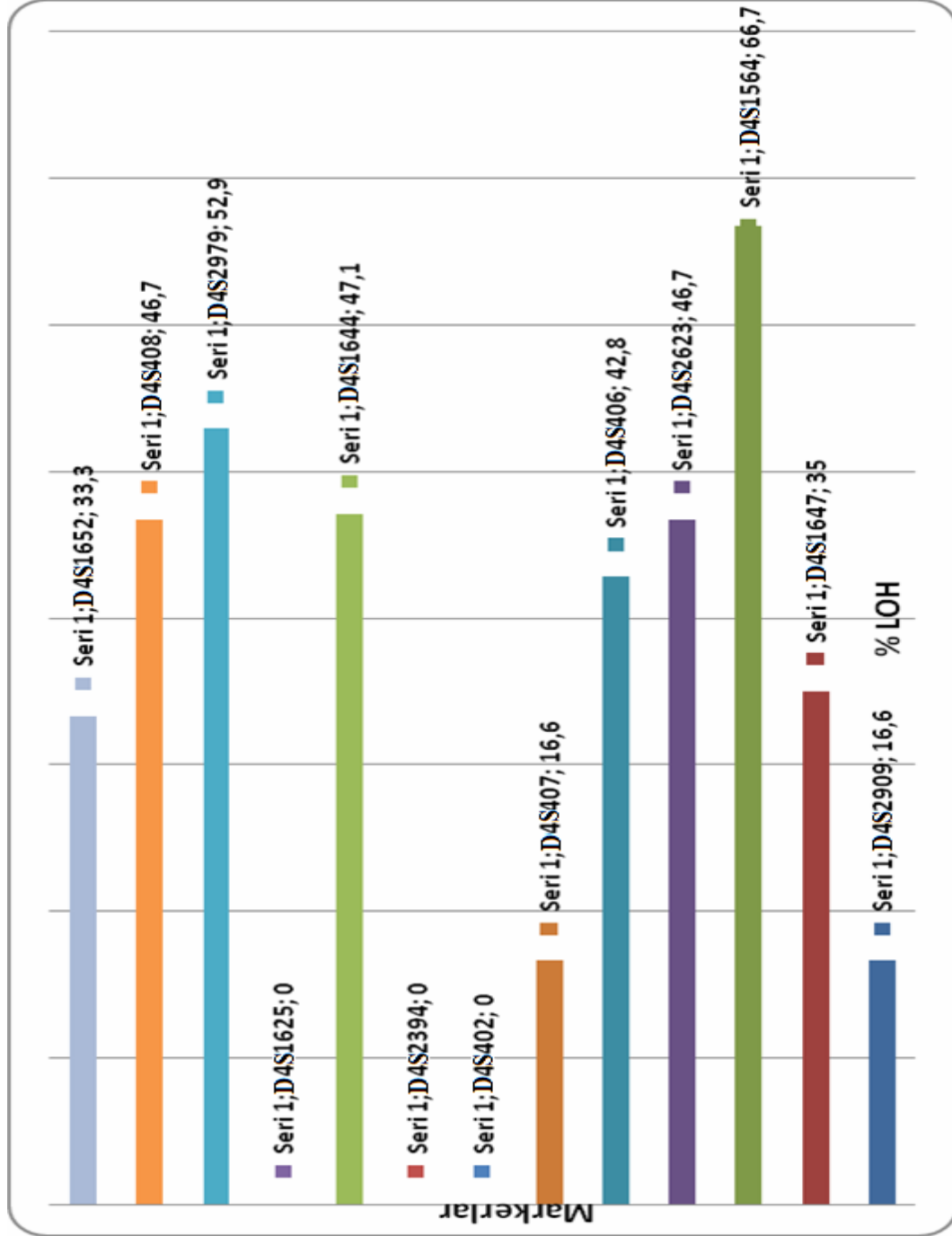
Şekil 5.26. D4S1652 markırına ait homozigot, heterozigot ve LOH'ün resmi (N: Normal, T: Tümör)

Mesane kanserli hastalarda LOH gözlenen markırlar Tablo 5.1’de verilmiştir.

**Tablo 5.1:** Mesane kanserli hastaların LOH analiz sonucu

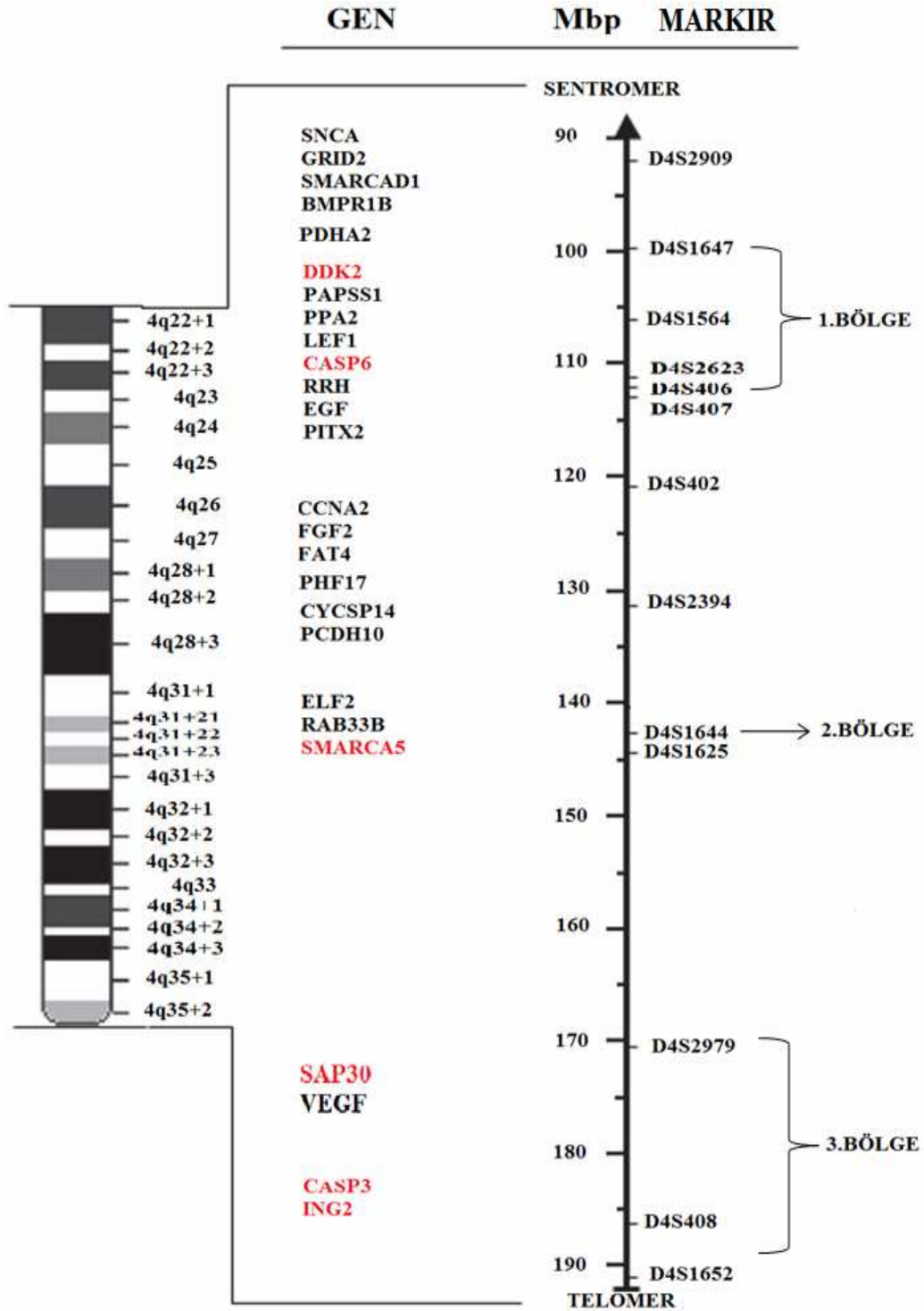
Hasta no	D4S2909	D4S1647	D4S1564	D4S2623	D4S406	D4S407	D4S402	D4S2394	D4S1644	D4S1625	D4S2979	D4S408	D4S1652
1	homozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot	homozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot
2	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot
3	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	heterozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	homozigot
4	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	heterozigotluk kaybı	homozigot	homozigot	homozigotluk kaybı	heterozigot
5	heterozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	yapılmadı	heterozigot	heterozigot	homozigot	homozigot	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot
6	yapılmadı	heterozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot	yapılmadı
7	yapılmadı	heterozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigot
8	yapılmadı	heterozigotluk kaybı	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	homozigot	homozigot	homozigotluk kaybı	heterozigot	heterozigot
9	homozigot	yapılmadı	homozigot	heterozigot	yapılmadı	yapılmadı	homozigot	yapılmadı	homozigot	homozigot	heterozigot	heterozigot	yapılmadı
10	yapılmadı	yapılmadı	homozigot	heterozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	heterozigotluk kaybı	homozigot	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı
11	yapılmadı	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	homozigot	homozigot	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot
12	heterozigot	yapılmadı	yapılmadı	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigot
13	homozigot	heterozigot	yapılmadı	heterozigotluk kaybı	homozigot	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	homozigot	homozigot	heterozigot	yapılmadı	homozigot
14	yapılmadı	heterozigot	heterozigot	heterozigot	heterozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	heterozigot	yapılmadı	homozigot
15	heterozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	heterozigot	heterozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	heterozigot	yapılmadı	homozigot
16	homozigot	heterozigot	homozigot	homozigot	heterozigot	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	homozigot	homozigot	homozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	homozigot
17	yapılmadı	heterozigotluk kaybı	heterozigot	yapılmadı	yapılmadı	heterozigot	yapılmadı	yapılmadı	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	homozigotluk kaybı	heterozigot
18	yapılmadı	yapılmadı	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigotluk kaybı	heterozigot
19	heterozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	heterozigot	yapılmadı	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	heterozigot
20	homozigot	heterozigot	homozigot	heterozigot	homozigot	yapılmadı	heterozigot	heterozigot	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	homozigotluk kaybı	heterozigot
21	yapılmadı	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	heterozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	homozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot
22	homozigot	heterozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	heterozigotluk kaybı	yapılmadı	heterozigot	heterozigot	homozigot	homozigot	yapılmadı	homozigotluk kaybı	heterozigot
23	yapılmadı	heterozigot	homozigot	heterozigot	homozigot	heterozigot	heterozigot	heterozigot	homozigot	homozigot	heterozigot	homozigotluk kaybı	heterozigot
24	yapılmadı	heterozigot	heterozigotluk kaybı	heterozigot	homozigot	heterozigot	heterozigot	heterozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	homozigot	heterozigot	heterozigot
25	yapılmadı	heterozigot	heterozigotluk kaybı	homozigot	homozigot	heterozigot	heterozigot	heterozigot	homozigot	homozigot	homozigot	yapılmadı	homozigot

Yapılan LOH analizi sonucu en yüksek LOH oranı %66, 7 ile D4S1564 nolu markırın yerleştiği bölgede görülmüştür. Bu markırdan sonra en yüksek LOH oranları %52, 9 ile D4S2979; %47, 1 ile D4S1644 ve %46, 7 ile D4S408 ve D4S2623 markırlarının yerleştiği bölgelerde görülmüştür. Diğer markırlarda %42, 8 ile %0 oranında değişen LOH oranı tespit edilmiştir (Şekil 5.27).



Şekil 5.27. Markırlara göre LOH dağılımının grafiksel gösterimi

Kromozom 4q22-35 bölgesinde bulunan markırların yeri ve bu bölgelerde bulunan genlerin yerleri National Center of Biotechnology Information (NCBI) [54] 'den sağlanmıştır.



Şekil 5.28. Kromozom 4q22-35 bölgesinde bulunan markırlar ve buldukları bölgelerde bulunan genlerin yerlerini gösteren kromozom haritası [54]

## BÖLÜM 6

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Mesane kanserine özgü yapılan LOH çalışmalarında 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 17 ve 21 gibi birçok farklı kromozom üzerinde değişen oranlarda heterozigotluk kayıpları tespit edildiği bildirilmiştir [6, 7, 8, 9, 10, 11, 12]. Bu kromozomlar arasından özellikle kromozom 9, 11 ve 17'de diğer kromozomlara oranla daha yüksek oranda heterozigotluk kaybı bulunmuştur [8, 9, 11, 12]. Kromozom 9'un hem p hem de q kolunda yaklaşık % 50 ve üzerinde kayıplar bulunmuş ve bu kromozom üzerindeki dört bölge (9p21, 9q22, 9q32-33, 9q34) mesane kanserinde aday tümör baskılayıcı gen bölgesi olarak belirlenmiştir. Bu bölgelerde yer alan aday tümör baskılayıcı genler; 9p21'de CDKN2A/ARF (p16/p14ARF) ve CDKN2B (p15), 9q22'de PTCH, 9q32-33'te DBC1 ve 9q34'te TSC1'dir [46]. On yedinci kromozomun p kolundaki LOH oranının yüksek olması da dikkat çekicidir. Çünkü bu kromozom üzerinde 17p13 bölgesinde p53 geni bulunmaktadır [10, 12, 22].

Mesane kanserinde kromozom 4 ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda ise kromozom 4q'da yüksek LOH oranları saptandığı bildirilmiş, bu bölgenin mesane kanseri gelişimi ile ilişkisi olabileceği ileri sürülmüştür. Bu çalışmalarda 4. kromozomun q kolunda %22 ile %83 arasında değişen kısmi kayıplar bulunmuştur [8, 9, 10, 25, 28]. Bununla birlikte kromozom 4 ile ilgili olarak yapılan LOH çalışmalarında baş ve boyun kanserleri, küçük hücreli akciğer kanserleri, hepatoselüler kanserler, göğüs kanserlerinde ve oral kanserlerde kromozom 4q bölgesinde yüksek LOH oranlarının tespit edildiği bildirilmiştir ve bu çalışmalarda da bu kromozomun mesane kanseri ile ilişkisi olabileceği ileri sürülmüştür [13, 14, 15, 16, 17].

Bu tez çalışmasında yirmibeş mesane kanserli hastada kromozom 4q 22-35 bölgesinde % 0 ile % 66,7 arasında değişen oranlarda LOH tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda kromozom 4q22-35 bölgesine yerleşmiş heterozigotluk kaybı fazla olan üç bölge dikkat çekmektedir. Bu bölgeler D4S1564, D4S1644 ve

D4S2979 markırlarının yerleştiği bölgelerdir. Kromozom 4q22-35 bölgesi ile ilgili baş ve boyun kanserleri ve ağız kanserlerinde yapılan çalışmalarda D4S1564 markırının yerleştiği bölgede %30 ve üzerinde, D4S1644 markırının yerleştiği bölgede %38 ile 45 arasında ve D4S2979 nolu markırın yerleştiği bölgede %25 ile 40 arasında değişen oranlarda LOH'e rastlandığı bildirilmiştir [14, 17].

Bu çalışma sonucu ortaya çıkan üç bölge ve bu bölgelerdeki önemli genler daha ayrıntılı incelenirse birinci bölge en fazla LOH oranına sahip olan D4S1564 markırının yerleştiği kromozom bölgesidir. Bu markırdaki LOH oranı %66,7'dır. Bu markırın yanı sıra, hemen üzerindeki D4S1647 ve altındaki D4S2623 ve D4S406 markırlarında da sırasıyla % 35, %46,7 ve %42,8 oranında anlamlı kayıpların bulunması burada bir tümör baskılayıcı gen olabileceğini düşündürmektedir. Bu bölgede bulunan genler PDHA2, DKK2, PAPSS1, PPA2, LEF1, CASP6, RRH, EGF ve PITX2'dir.

PDHA2'nın sadece post-mayotik spermatogonik hücrelerde eksprese edildiği bildirilmiştir [55, 56]. Bu genin aday tümör baskılayıcı gen olma ihtimali yoktur.

Yapılan birçok çalışmada DDK genlerinin epigenetik olarak susturulmasının gastrointestinal kanserlerde [57, 58] ve kolorektal kanserlerde [57] yaygın olduğu bildirilmiştir. DDK2'nin epigenetik olarak böbrek hücre karsinomasının yüksek derece ve evrelerinde metilasyonla susturulduğu ve DDK2'nin apoptotik ve hücre döngüsü yolakları ile böbrek kanserinin ilerlemesini önlediği [59] ve DDK2 geninin ekspresyonunun azalmasının malignant melanoma üzerine etkili olduğu da bildirilmiştir [60, 61].

PAPSS1 geninin tümör baskılayıcı gen olduğuna dair bir bulgu yoktur, hatta baş ve boyun kanserleri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada bu genin tümör baskılayıcı gen olma ihtimalinin düşük olduğu belirtilmiştir [14].

CASP6, kaspaz tümör baskılayıcı gen ailesinin bir üyesidir ve kaspaz-6 ya da mch2 denilen bir proteinin sentezinden sorumludur. Bu ailede efektör kaspazlar denilen gruba dahil edilirler. Efektör kaspazlar hücrenin apoptozundan sorumludurlar. Kaspaz 6 aktivasyonu Lamin A ve diğer yüzeylerin bölünmesiyle apoptozu indükler. Bir çalışmada kaspaz 6'nın tek başına veya diğer mutasyona uğramış apoptoz ilişkili

genlerle birlikte tümörogeneze dahil olabileceği öne sürülmüştür [62]. Kaspaz 6 ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada bu genin bu bölgedeki en muhtemel tümör baskılayıcı gen olduğu ve apoptotik yolda önemli bir molekül olduğu bildirilmiştir [63]. Birçok kanser türünün ortaya çıkmasında Kaspaz 6'nın ekspresyonunda azalmanın etkili olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda Kaspaz 6 gen mutasyonu gastrik ve kolorektal kanserlerde gösterilmiş ve bu genin ekspresyonunun gastrik kanser patogenezi ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür [62, 64]. Baş ve boyun kanserlerinde ve oral kanserlerde kromozom 4q22-35 bölgesi üzerine yapılan çalışmalarda kaspaz 6 bu bölge için aday tümör baskılayıcı gen olarak bildirilmiştir [14, 17].

Baş ve boyun kanserleri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada retinaya özgü RRH'nin tümör baskılayıcı gen olma ihtimalinin düşük olduğu bildirilmiştir [14].

PITX2, LEF1 ve EGF genlerinin onkogenik özellikte olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [65, 66]. PITX2'nin siklin D1 ve c-myc gibi doğrudan büyüme düzenleyici genler üzerinden hareket ettiği [66] ve PITX2-siklin D2 yolağının aşırı aktivasyonunun tiroid tümörogenezini teşvik ettiği bildirilmiştir [65]. LEF1'in androjen bağımsız prostat kanserinde aşırı eksprese edildiği belirtilmiştir [67]. EGF reseptörü EGFR'nin yüksek seviyelerinin ağız sküamöz hücre kanserinde invazif karsinomun ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir [68].

İkinci bölge %47,1 LOH oranına sahip D4S1644 markırının yerleştiği bölgedir. Bu bölgenin alt kısmını ve üst kısmını tarayan markırlarda herhangi bir kayıp bulunamamıştır. Bu bölgedeki genler; ELF2, RAB33B, SMARCA5'tir.

ELF2, kanser gelişimi ile ilgili VCP genini transaktive etmektedir [69]. Yapılan çalışmalarda kanser hücrelerinde VCP ekspresyonunun yüksek seviyeleri karaciğer, mide, prostat ve yemek borusu kanseri olan hastaların kötü prognozu ve nüks oranı artışı ile korele olduğu bildirilmiştir [70].

RAB33B, RAS onkogen ailesinin bir üyesidir [71]. Bu genin aday tümör baskılayıcı gen olma ihtimali yoktur.



SMARCA5, SWI/SNF protein ailesinin bir üyesidir [72]. SMARCA5'in deregüasyonu daha önce akut lösemide bildirilmiştir [73]. Kromozom 4q22-35 bölgesinde baş ve boyun kanserleri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada SMARCA5 geni bu bölge için aday tümör baskılayıcı gen olarak bildirilmiştir [14].

Üçüncü kayıp bölgesi ise D4S2979 markırının yerleştiği bölgedir. Bu markırda heterozigotluk kaybı %52,9 olarak bulunmuştur. Bu markırın altında bulunan D4S408 ve D4S1652 nolu markırlarda ise kayıp sırasıyla %46,7 ve %33,3 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar D4S2979 markırının yerleştiği 4q bölgesinden telomere kadar olan bölgede büyük bir kayıp olduğunu düşündürmektedir. Bu bölgede bulunan genler SAP30, VEGFC, CASP3 ve ING2'dir.

SAP30, bazal hücre karsinomunda aday tümör baskılayıcı gen olarak gösterilmiştir [74]. Baş ve boyun kanserleri ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada da aday tümör baskılayıcı gen olarak bildirilmiştir [14].

VEGF-C'nin aşırı ekspresyonunun lenfatik metastazda önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir [75]. Yapılan çalışmalarda VEGF-C'nin aşırı ekspresyonunun adenokarsinom [76], prostat kanseri [77, 78], mide kanseri [79] ile ilişkisi bildirilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda bu genin aday tümör baskılayıcı gen olması mümkün değildir.

CASP3 de CASP6 geni gibi kaspaz gen ailesinden efektör kaspazlara dahil edilir. CPP32 adıyla da bilinir. Kaspaz 3 apoptozda kritik bir göreve sahiptir [80] ve daha önce yapılan çalışmalarda kaspaz 3'ün ekspresyonundaki azalmanın göğüs kanseri [80,81] mide kanseri [82] ve prostat kanseri [83] gelişiminde önemli role sahip olduğu bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada kaspaz 3'ün kolon kanseri, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, mide kanseri ve hepatoselüler kanser gibi farklı kanser türlerinde mutasyona uğradığı bildirilmiştir [84].

ING2, ING gen ailesinin beş üyesinden biridir [14, 85, 86]. Hücre döngüsü, apoptozu ve yaşlanmada aday tümör baskılayıcı gen rolüne sahiptir [85, 87]. ING2 gen ekspresyonundaki azalma melanoma [88, 89] HNSCC [90], akciğer kanseri [87], HCC [91, 92], ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda belirtilmiş, ING2 bu kanser

türleri ve baş ve boyun kanserleri [14, 86] için aday tümör baskılayıcı gen olarak bildirilmiştir.

Mesane kanserinde erken tanı için aday tümör baskılayıcı genlerin tanımlanmasının önemi büyüktür. Yapılan bu çalışmada mesane kanserlerinde kromozom 4q22-35 bölgesi taranmış ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda CASP6, DDK2, SAP30, CASP3, SMARCA5 ve ING2 genlerinin aday tümör baskılayıcı gen olabileceği belirlenmiştir. Bu bölgelerin ve genlerin mesane kanseri ile ilgisinin kesin olarak belirlenebilmesi için mesane kanserli hastalarda bu genlerin ekspresyon analizi yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- [1] Dodurga, Y. (2006). *Mesane Kanseri Olgularında Fibroblast Büyüme Faktörü Reseptörü 3 (FGFR3) A248C, S249C, G372C, T375C mutasyonlarının varlığı*. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale Üniversitesi, Denizli.
- [2] Kaufman, D.S., Shipley, W.U., Feldman, A.S. (2009). Bladder cancer. *Lancet*, **374**, 239-249.
- [3] Abraham, R., Pagano, F., Gomella, L.G., Baffa, R. (2007). Chromosomal deletions in bladder cancer: shutting down pathways. *Frontiers in Bioscience*, **12**, 826-838.
- [4] Cooper M.G., Hausman R.E. (2006). *Hücre, Moleküler Yaklaşım*, İzmir Tıp Kitabevi 3.baskı, s.631-666.
- [5] Cengiz, B. (2007). *Fine Deletion Mapping of Chromosome 2q21-37 Shows Three Preferentially Deleted Regions in Oral Cancer*. Doktora Tezi, Okayama Üniversitesi, Japonya.
- [6] Langbein, S., Szakacs, O., Wilhelm, M., Sukosd, F., Weber, S., Jauch, A., Beltran, A.L., Alken, P., Kälble, T., Kovacs, G. (2002). Alteration of the LRP1B Gene Region is Associated with High Grade of Urothelial Cancer. *Laboratory Investigation*, **82**, 639-643.
- [7] Wada, T., Louhelainen, J., Hemminki, K., Adolfsson, J., Wijkström, H., Norming, U., Borgström, E., Hansson, J., Sandstedt, B., Steineck, G. (2000). Bladder Cancer: Allelic Deletions at and around the Retinoblastoma Tumor Suppressor Gene in Relation to Stage and Grade. *Clinical Cancer Research*, **6**, 610-615.
- [8] Hurst, C.D., Fiegler, H., Carr, P., Williams, S., Carter, N.P., Knowles, M.A. (2004). High-resolution analysis of genomic copy number alterations in bladder cancer by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*, **23**, 2250-2263.

- [9] Tzai T-S., Chen H. H-W., Chan S-H., Ho C-L., Tsai Y-S., Cheng H-L., Dai Y-C., Lin J.S-N., Yang W-H., Chow N-H. (2003). Clinical significance of allelotyping for urothelial carcinoma. *Urology*, **62**, 378-384.
- [10] Simon, R., Bürger, H., Brinkschmidt, C., Böcker, W., Hertle, L., Terpe, H-J. (1998). Chromosomal Aberrations Associated With Invasion in Papillary Superficial Bladder Cancer. *Journal of Pathology*, **185**, 345-351.
- [11] Nishiyama, H., Takahashi, T., Kakehi, Y., Habuchi, T., Knowles, M.A. (1999). Homozygous Deletion at the 9q32-33 Candidate Tumor Suppressor Locus in Primary Human Bladder Cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **26**, 171-175.
- [12] Saran K.K., Gould D., Godec C.J. Verma R.S. (1996). Genetics of bladder cancer. *Journal of Molecular Medicine*, **74**, 441-445.
- [13] Piao, Z., Park, C., Park, J-H, Kim, H. (1998). Deletion Mapping of Chromosome 4q in Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Cancer*, **79**, 356-360.
- [14] Çetin E, Cengiz B, Gunduz E, Gunduz M, Nagatsuka H, Beder L.B, Fukushima K., Pehlivan D, Ozaslan M., Yamanaka N., Nishizaki K., Shimizu K., Nagai N. (2008). Deletion mapping of chromosome 4q 22-35 and identification of four frequently deleted regions in head and neck cancers, *Neoplasma*, **55**, 299-304.
- [15] Shivapurkar, N., Sood, S., Witsuba, I.I., Virmani, A.K., Maitra, A., Milchgrub, S., Minna, J.D., Gazdar A.F. (1999a). Multiple Regions of Chromosome 4 Demonstrating Allelic Losses in Breast Carcinomas. *Cancer Research*, **59**, 3576-3580.
- [16] Shivapurkar, N., Virmani, A.K., Wistuba, I.I., Milchgrub, S., Mackay, B., Minna, J.D., Gazdar, A.F. (1999b). Deletions of Chromosome 4 at Multiple Sites Are Frequent in Malignant Mesothelioma and Small Cell Lung Carcinoma. *Clinical Cancer Research*, **5**, 17-23.
- [17] Shinno, Y., Gunduz, E., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Tsujigiwa, H., Cengiz, B., Lee, Y-J., Tamamura, R., Ouchida, M., Fukushima, K., Shimizu, K., Nagai, N.(2005). Fine deletional mapping of chromosome 4q22-35 region in oral cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, **16**, 93-98.

- [18] Tsai, Y.C., Nichols, P.W., Hiti, A.L., Williams, Z., Skinner, D.G., Jones, P.A. (1990). Allelic Losses of Chromosomes 9, 11 and 17 in Human Bladder Cancer. *Cancer Research*, **50**, 44-47.
- [19] Miyao, N., Tsai, Y.C., Lerner, S.P., Olumi, A.F., Spruck III, C.H., Gonzalez-Zulueta, M., Nichols, P.W., Skinner, D.G., Jones, P.A. (1993). Role of Chromosome 9 in Human Bladder Cancer. *Cancer Research*, **53**, 4066-4070.
- [20] Ruppert, M.J., Tokino, K., Sidransky, D. (1993). Evidence for Two Bladder Cancer Suppressor Loci on Human Chromosome 9. *Cancer Research*, **53**, 5093-5095.
- [21] Cairns, P., Shaw, M.E., Knowles, M.A. (1993). Preliminary Mapping of the Deleted Region of Chromosome 9 in Bladder Cancer. *Cancer Research*, **53**, 1230-1232.
- [22] Knowles M.A., Elder P.A., Williamson M., Cairns J.P., Shaw M.E. and Law M.G. (1994). Allelotype of human bladder cancer. *Cancer Research*, **54**, 531-538.
- [23] Polascik, T.J., Cairns, P., Chang, W.Y.H., Schoenberg, M.P., Sidransky, D. (1995). Distinct Regions of Allelic Loss on Chromosome 4 in Human Primary Bladder Cancer. *Cancer Research*, **55**, 5396-5399.
- [24] Chang, W.Y-H, Cairns, P., Schoenberg, M.P., Polascik, T.J., Sidransky, D., (1995). Novel Suppressor Loci on Chromosome 14q in Primary Bladder Cancer. *Cancer Research*, **55**, 3246-3249.
- [25] Rosin, M.P., Cairns, P., Epstein, J.I., Schoenberg, M.P., Sidransky, D. (1995). Partial Allelotype of Carcinoma *in situ* of the Human Bladder Cancer. *Cancer Research*, **55**, 5213-5216.
- [26] Habuchi, T., Yoshida, O., Knowles, M.A. (1997). A novel candidate tumour suppressor locus at 9q32-33 in bladder cancer: localization of the candidate region within a single 840 kb YAC. *Human Molecular Genetics*, **6**, 913-919.
- [27] Habuchi, T., Luscombe, M., Elder, P.A., Knowles, M.A. (1998). Structure and Methylation-Based Silencing of a Gene (DBCCR1) within a Candidate Bladder Tumor Suppressor Region at 9q32-q33. *Genomics*, **48**, 277-288.

- [28] Shaw M.E., Elder P.A., Abbas A. and Knowles M.A. (1999) Partial allelotype of schistosomiasis-associated bladder cancer *International Journal of Cancer*, **80**, 656-661.
- [29] Hornigold, N., Devlin, J., Davies, A.M., Aveyard, J.S., Habuchi, T., Knowles, M.A. (1999). Mutation of the 9q34 gene *TSC1* in sporadic bladder cancer. *Oncogene*, **18**, 2657-2661.
- [30] Hoque M.O., Lee R.C.C., Cains P., Schoenberg M., Sidransky D. (2003). Genome-wide genetic characterization of bladder cancer: a comparison of high-density single nucleotide polymorphism arrays and PCR-based microsatellite analysis. *Cancer Research*, **63**, 2216-2222.
- [31] Chan, M.W.Y., Hui, A.B-Y., Yip, S.K-H., Ng, C-F., Lo, K-W., Tong, J.H.M., Chan, A.W.H., Cheung, H.Y., Wong, W.S., Chan, P.S.F., Lai, F.M.M., To, K-F. (2009). Progressive increase of genetic alteration in urinary bladder cancer by combined allelotyping analysis and comparative genomic hybridization. *International Journal of Oncology*, **34**, 963-970.
- [32] Bozcuk, A.N. (2000). *Genetik*. Palme Yayıncılık, Ankara s. 295-299.
- [33] Spruck III, C.H., Ohneseit, P.F., Gonzalez-Zulueta, M., Esrig, D., Miyao, N., Tsai, Y.C., Lerner, S.P., Schmütte, C., Yang, A.S., Cote, R., Dubeau, L., Nichols, P.W., Hermann, G.G., Steven, K., Horn, T., Skinner, D.G., Jones, P.A. (1994). Two Molecular Pathways to Transitional Cell Carcinoma of the Bladder. *Cancer Research*, **54**, 784-788.
- [34] [http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237\\_tur\\_p1-104.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789283204237_tur_p1-104.pdf)
- [35] Ekmekçi, A. (2006). *Gen: Genetik Değişim ve Hastalıklar*. Gazi Kitabevi, Ankara s.217-245.
- [36] Valesco, A., Pallares, J., Santacana, M., Yeramian, A., Dolcet, X., Eritja, N., Puente, S., Sorolla, A., Llecha, N., Matias-Guiu, X. (2008). Loss of Heterozygosity in Endometrial Carcinoma. *International Journal of Gynecological Pathology*, **27**, 305-317.

- [37] Knudson A.G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **68**, 820-823.
- [38] Cristensen, M., Jensen, M.A., Wolf, H., Orntoft, T.F. (1998). Pronounced Microsatellite Instability in Transitional Cell Carcinomas from Young Patients with Bladder Cancer. *International journal of Cancer*, **79**, 396-401.
- [39] [http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/radyoloji/dr\\_esra\\_cay.pdf](http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/pdf/radyoloji/dr_esra_cay.pdf)
- [40] Knowles, M.A. (2007). Tumor supressor loci in bladder cancer. *Frontiers of Bioscience*, **12**, 2233-2251.
- [41] Negri, E., La Vecchia, C. (2001). Epidemiology and prevention of bladder cancer. *European Journal of Cancer Prevention*, **10**, 7-14.
- [42] Özgöz, A. (2005). *Mesane Kanseri Tanılı Olgularda p53 geni Mutasyon analizi*. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon.
- [43] İncekara, K. (2009). *Türk Mesane Kanseri Hastalarında Sitokrom p-450 Polimorfizmlerinin Araştırılması*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Haliç Üniversitesi, İstanbul.
- [44] Gürsoy, G. (2007). *1993-1998 Yıllarında İzmir İlinde Tanı Almış 15 Yaş Üzeri Erkeklerde Mesane Kanseri Olgularının Meslek ve İş Tanımlaması*. Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- [45] [www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/staging](http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/staging)
- [46] Knowles, M.A. (2006). Molecular subtypes of bladder cancer: Jekyll and Hyde or chalk or cheese? *Carcinogenesis*, **27**, 361-373.
- [47] Zeegers, M.P.A., Tan, F., Dorant, E., van der Brandt, P.A. (2000). The Impact of Characteristics of Cigarette Smoking on Urinary Tract Cancer Risk. *Cancer*, **89**, 630-639.
- [48] Zeegers, M.P.A., Kellen, E., Buntinx, F., van den Brandt, P.A. (2004). The association between smoking, beverage consumption, diet and bladder cancer: a systematic literature review. *World Journal of Urology*, **21**, 392-401.

- [49] Augustine, A., Hebert, J.R., Kabat, G.C., Wynder, E.L. (1988). Bladder Cancer in Relation to Cigarette Smoking. *Cancer Research*, **48**, 4405-4408.
- [50] Murta-Nascimento, C., Silverman, D.T., Kogevinas, M., Garcia-Closas, M., Rothman, N., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Villanueva, C., Dosemeci, M., Real, F.X., Malats, N. (2007). Risk of Bladder Cancer Associated with Family History of Cancer: Do Low-Penetrance Polymorphisms Account for the Increase in Risk? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention* **16**, 1595-1600.
- [51] Özcel, M.A. (2007). *Özcel'in Tıbbi Parazit Hastalıkları*. Türkiye Parazitoloji Derneği Yayını No: 22. İzmir.
- [52] Rosenberg, J.E., Hahn, W.C. (2009). Bladder Cancer: modeling and translation. *Genes & Development*, **23**, 655-659.
- [53] Kausch, I., Böhle, A. (2002). Molecular Aspects of Bladder Cancer, III. Prognostic Markers of Bladder Cancer. *European Urology*, **41**, 15-29.
- [54] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- [55] Iannello, R.C., Kola, I., Dahl, H-H.M. (1993). Temporal and Tissue-specific Interactions Involving Novel Transcription Factors and the Proximal Promoter of the Mouse Pdha-2 Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, **268**, 22581-22590.
- [56] Datta, U., Wexler, I.D., Kerr, D.S., Raz, I., Patel, M.S. (1999). Characterization of the regulatory region of the human testis-specific form of the pyruvate dehydrogenase  $\alpha$ -subunit (PDHA-2) gene. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1447**, 236-243.
- [57] Sato, H., Suzuki, H., Toyota, M., Nojima, M., Maruyama, R., Sasaki, S., Takagi, H., Sogabe, Y., Sasaki, Y., Idogawa, M., Sonoda, T., Mori, M., Imai, K., Tokino, T., Shinomura, Y. (2007). Frequent epigenetic inactivation of *DICCKOPF* family gene in human gastrointestinal tumors. *Carcinogenesis*, **28**, 2459-2466.
- [58] Maehata, T., Taniguchi, H., Yamamoto, H., Nosho, K., Adachi, Y., Miyamoto, N., Miyamoto, C., Akutsu, N., Yamaoka, S., Itoh, F. (2008). Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, **14**, 2702-2714.



- [59] Hirata, H., Hinoda, Y., Nakajima, K., Kawamoto, K., Kikuno, N., Kawakami, K., Yamamura, S., Ueno, K., Majid, S., Saini, S., Ishii, N., Dahiya, R. (2009). Wnt Antagonist Gene DDK2 Is Epigenetically Silenced and Inhibits Renal Cancer Progression through Apoptotic and Cell Cycle Pathways. *Clinical Cancer Research*, **15**, 5678-87.
- [60] Kuphal, S., Lodermeier, S., Bataille, F., Schuierer, M., Hoang, B.H., Bosserhoff, A.K. (2006). Expression of *Dickkopf* genes is strongly reduced in malignant melanoma. *Oncogene*, **25**, 5027-5036.
- [61] Matsui, A., Yamaguchi, T., Maekawa, S., Miyazaki, C., Takano, S., Uetake, T., Inoue, T., Otaka, M., Otsuka, H., Sato, T., Yamashita, A., Takahashi, Y., Enomoto, N. (2009). DICKKOPF-4 and -2 genes are upregulated in human colorectal cancer. *Cancer Science*, **100**, 1923-1930.
- [62] Lee, J.W., Kim, M.R., Soung, Y.H., Nam, S.W., Kim, S.H., Lee, J.Y., Yoo, N.J., Lee, S.H. (2006). Mutational analysis of the *CASP6* gene in colorectal and gastric carcinomas. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **144**, 646-50.
- [63] Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Alnemri, E.S. (1995). *Mch2*, a New Member of the Apoptotic *Ced-3/Ice* Cysteine Protease Gene Family. *Cancer Research*, **55**, 2737-2742.
- [64] Yoo, N.J., Lee, J.W., Kim, Y.J., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W. Park, W.S., Lee, J.Y., Lee, S.H. (2004). Loss of caspase-2, -6 and -7 expression in gastric cancers. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, **112**, 330-5.
- [65] Huang, Y., Guigon, C.J., Fan, J., Cheng, S-Y., Zhu, G-Z. (2010). Pituitary homeobox 2 (PITX2) promotes thyroid carcinogenesis by activation of cyclin D2. *Cell Cycle*, **9**: **7**, 1333-1341.
- [66] Baek, S.H., Kioussi, C., Briata, P., Wang, D., Nguyen, H.D., Ohgi, K.A., Glass, C.K., Wynshaw-Boris, A., Rose, D.W., Rosenfeld, M.G. (2003). Regulated subset of G1 growth-control genes in response to derepression by the Wnt pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 3245-3250.

- [67] Li, Y., Wang, L., Zhang, M., Melamed, J., Liu, X., Reiter, R., Wei, J., Peng, Y., Zou, X., Pellicer, A., Garabedian, M.J., Ferrari, A., Lee, P. (2009). LEF1 in Androgen-Independent Prostate Cancer: Regulation of Androgen Receptor Expression, Prostate Cancer Growth, and Invasion. *Cancer Research*, **69**, 3332-3338.
- [68] Kanata, K., Sheikh Ali, M.A.L., Nagatsuka, H., Liu, G.R., Ryou, P.H., Takayama, M., Imagami, H., Nagai, N. (2005). Detecting the (Epidermal Growth Factor Receptor) EGFR Gene Amplification in Oral Carcinogenesis. *Journal of Hard Tissue Biology*, **14**, 251-252.
- [69] Qiu, Y., Morii, E., Zhang, B., Tomita, Y., Aozasa, K. (2008). E74-like factor 2 transactivates valosin-containing protein gene, a gene involved in cancer growth. *Experimental and Molecular Pathology*, **84**, 226-229.
- [70] Zhang, B., Tomita, Y., Qiu, Y., He, J., Morii, E., Noguchi, S., Aozasa, K. (2007). E74-like factor 2 regulates valosin-containing protein expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **356**, 536-541.
- [71] Hyakkoku, K., Hamanaka, J., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H. (2010). Proteomic approach with LCMS-IT-TOF identified an increase of Rab33B after transient focal cerebral ischemia in mice. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, **2**, 20.
- [72] Hisaoka, M., Matsuyama, A., Nagao, Y., Luan, L., Kuroda, T., Akiyama, H., Kondo, S., Hashimoto, H. (2011). Identification of Altered MicroRNA Expression Patterns in Synovial Sarcoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, **50**, 137-145.
- [73] Stopka, T., Zakova, D., Fuchs, O., Kubrova, O., Blafkova, J., Jelinek, J., Necas, E., Zivny, J. (2000). Chromatin remodeling gene SMARCA5 is dysregulated in primitive hematopoietic cells of acute leukemia. *Leukemia*, **14**, 1247-1252.
- [74] Sironi, E., Cerri, A., Tomasini, D., Sirchia, S.M., Porta, G., Rossella, F., Grati, F.R., Simoni, G. (2004). Loss of heterozygosity on chromosome 4q32-35 in sporadic basal cell carcinomas: evidence for the involvement of *p33ING2/INGIL* and *SAP30* genes. *Journal of Cutaneous Pathology*, **31**, 318-322.
- [75] Zhuang, Z., Jian, P., Longjiang, L., Bo, H., Wenlin, X. (2010). Oral cancer cells with different potential of lymphatic metastasis displayed distinct biologic behaviors and gene expression profiles. *Journal of Oral Pathology Medicine*, **39**, 168-175.

- [76] Li, M., Chen, H., Diao, L., Zhang, Y., Xia, C., Yang, F. (2010). Caveolin-1 and VEGF-C promote lymph node metastasis in the absence of intratumoral lymphangiogenesis in non-small cell lung cancer. *Tumori*, **96**, 734-743.
- [77] Zhang, H., Muders, M.H., Li, J., Rinaldo, F., Tindall, D.J., Datta, K. (2008). Loss of NKX3.1 Favors Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression in Prostate Cancer. *Cancer Research*, **68**, 8770-8778.
- [78] Tsurusaki, T., Kanda, S., Sakai, H., Kanetake, H., Saito, Y., Alitalo, K., Koji, T. (1999). Vascular endothelial growth factor-c expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *British Journal of Cancer*, **80**, 309-313.
- [79] Han, F.-H., Li, H.-M., Zheng, Y.-L., Zhan, W.-H. (2010). The effect of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) -C and VEGF receptor-3 on the clinical outcome in patients with gastric carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology*, **36**, 1172-1179.
- [80] O'Donovan, N., Crown, J., Stunell, H., Hill, A.D.K., McDermott, E., O'Higgins, N., Duffy, M.J. (2003). Caspase 3 in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research*, **9**, 738-742.
- [81] Devarajan, E., Sahin, A.A., Chen, J.S., Krishnamurthy, R.R., Aggarwal, N., Brun, A-M., Sapino, A., Zhang, F., Sharma, D., Yang, X-H., Tora, A.D., Mehta, K. (2002). Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. *Oncogene*, **21**, 8843-8851.
- [82] Kania, J., Konturek, S.J., Marlicz, K., Hahn, E.G., Konturek, P.C. (2003). Expression of Survivin and Caspase-3 in Gastric Cancer. *Digestive Diseases and Sciences*, **48**, 266-271.
- [83] Winter, R.N., Kramer, A., Borkowski, A., Kyprianou, N. (2001). Loss of Caspase-1 and Caspase-3 Protein Expression in Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, **61**, 1227-1232.
- [84] Soung, Y.H., Lee, J.W., Kim, S.Y., Park, W.S., Nam, S.W., Lee, J.Y., Nam J.y., Lee, S.H. (2004). Somatic mutations of CASP3 gene in human cancers. *Human Genetics*, **115**, 112-115.

- [85] Coles, A. H., Jones, S.N. (2009). The ING Gene Family in the Regulation of Cell Growth and Tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, **218**, 45-57.
- [86] Borkosky, S.S., Gunduz, M., Nagatsuka, H., Beder, L.B., Gunduz, E., Ali, M. AL S., Rodriguez, A.P., Cilek, M.Z., Tominaga, S., Yamanaka, N., Shimizu, K., Nagai, N. (2009). Frequent deletion of ING2 locus at 4q35.1 associates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal Cancer Research and Clinical Oncology*, **135**, 703-713.
- [87] Ythier, D., Brambilla, E., Binet, R., Nissou, D., Vesin, A., de Fraipont, F., Moro-Sibilot, D., Lantuejoul, S., Brambilla, C., Gazzeri, S., Pedeux, R. (2010). Expression of candidate tumor suppressor gene ING2 is lost in non-small cell lung carcinoma. *Lung Cancer*, **69**, 180-186.
- [88] Lu, F., Dai, D.L., Martinka, M., Ho, V., Li, G. (2006). Nuclear ING2 expression is reduced in human cutaneous melanomas. *British Journal of Cancer*, **95**, 80-86.
- [89] Ythier, D., Larrieu, D., Brambilla, C., Brambilla, E., Pedeux, R. (2008). The new tumor suppressor genes ING: Genomic structure and status in cancer. *International Journal of Cancer*, **123**, 1483-1490.
- [90] Li, X., Kikuchi, K., Takano, Y. (2011). ING Genes Works as Tumor Suppressor Genes in the Carcinogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Oncology*, ID 963614.
- [91] Gunduz, E., Gunduz, M., Beder, L.B., Tamamura, R., Nagatsuka, H., Nagai, N. (2008). Inhibitor of Growth (ING) Family: An Emerging Molecular Target for Cancer Therapy. *Journal of Hard Tissue Biology*, **17**, 1-10.
- [92] Zhang, H.-K., Pan, K., Wang, H., Weng, D.-S., Song, H.-F., Zhou, J., Huang, W., Li, J.-J., Chen, M.-S., Xia, J.-C. (2008). Decreased expression of ING2 gene and its clinicopathological significance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, **261**, 183-192.